

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 12 月 9 日 (09.12.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
**WO 2004/106382 A1**

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C07K 16/28, C12N 5/10,  
C12P 21/08, G01N 33/53, 33/577, A61K 39/395, G01N  
33/577, A61P 1/00, 1/04, 13/12, 15/00

(74) 代理人: 高橋 秀一, 外(TAKAHASHI, Shuichi et al.);  
〒5320024 大阪府大阪市淀川区十三本町 2 丁目 1 7 番  
8 5 号 武田薬品工業株式会社大阪工場内 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/007667

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が  
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,  
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,  
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) 国際出願日: 2004 年 5 月 27 日 (27.05.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2003-151577 2003 年 5 月 28 日 (28.05.2003) JP

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可  
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,  
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,  
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,  
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,  
IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF,  
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,  
TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田  
薬品工業株式会社 (TAKEDA PHARMACEUTICAL  
COMPANY LIMITED) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪  
市中央区道修町四丁目 1 番 1 号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 森 正明 (MORI,  
Masaaki) [JP/JP]; 〒3050821 茨城県つくば市春日  
3 丁目 8 - 5 Ibaraki (JP). 下村 行生 (SHIMOMURA,  
Yukio) [JP/JP]; 〒3050035 茨城県つくば市松代 3 丁目  
1 2 - 1 - 4 1 0 Ibaraki (JP).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ANTIBODY AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 抗体およびその用途

(57) Abstract: An antibody reacting specifically with a partial peptide in the N-terminal side or the C-terminal side of NPW that makes it possible to highly sensitively and specifically quantify NPW. Moreover, this antibody is useful as a preventive/remedy and a diagnostic for infertility, renal edema, digestive ulcer, gastric hyperacidity, etc.

(57) 要約: 本発明の NPW の N 端側または C 末端の部分ペプチドに特異的に反応する抗体は、NPW を感度よく特異的に定量することができ、さらには不妊症、腎性浮腫、消化性潰瘍、胃酸過多症などの予防・治療剤および診断薬等として有用である。

## 明 細 書

## 抗体およびその用途

## 5 技術分野

本発明は、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩に結合特異性を有する新規な抗体に関する。更に詳しくは、抗原抗体反応に基づく該ポリペプチドまたはその塩の定量法、中和活性を利用する該ポリペプチドまたはその塩が関与する疾患（例、拒食症、肥満症、腎性浮腫、抗利尿ホルモン分泌不適症候群、尿崩症、上部消化管疾患、胃酸過多症など）の診断および予防・治療剤の開発に有用な抗体などに関する。

## 15 背景技術

Gタンパク質共役型レセプターであるヒトGPR7およびヒトGPR8（Genomics、28巻、84-91頁、1995年、WO 95/12670号公報）の生体内リガンドとしてGPR8リガンド（本明細書中、NPWまたはニューロペプチドWと記載することがある）が単離同定された（WO 01/98494号公報、WO 02/44368号公報、J. Biol. Chem.、277巻、35826-35832頁、2002年）。NPWは、ラットまたはマウスGPR7（WO 02/44368号公報に記載のTGR26と同一のレセプター）のリガンドであることも示された（WO 02/44368、J. Biol. Chem.、277巻、35826-35832頁、2002年）。NPWの生理作用としては脳室内投与による摂食促進作用、血中プロラクチン分泌促進作用などが知られている（WO 01/98494、J. Biol. Chem.、277巻、35826-35832頁、2002年）。

NPWの生理作用または疾患に対する関与についてのさらなる検討が必要とされており、NPWを簡便かつ高感度に検出、定量する測定系が切望されていた。

## 発明の開示

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、NPWを認識する複数のモノクローナル抗体を作製し、該抗体が優れたNPWの中和活性を有することも見出し、該抗体を用いるNPWの優れた測定法を開発した。そして、さらに研究を行った結果、本発明を完成するに至った。

5       すなわち、本発明は、

(1)   配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のN端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体、

10   (2)   配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列の第1～13番目のアミノ酸配列を有するペプチドに特異的に反応する上記(1)記載の抗体、

15   (2a)   配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドに対して中和活性を有する上記(2)記載の抗体、

20   (3)   配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列の第1～3番目、第1～4番目、第1～5番目、第1～6番目、第1～7番目、第1～8番目、第1～9番目、第2～4番目、第2～5番目、第2～6番目、第2～7番目、第2～8番目、第2～9番目、第3～5番目、第3～6番目、第3～7番目、第3～8番目、第3～9番目、第4～6番目、第4～7番目、第4～8番目、第4～9番目、第5～7番目、第5～8番目、第5～9番目、第6～8番目、第6～9番目および第7～9番目のアミノ酸配列から選ばれる少なくともひとつを含有するペプチドに特異的に反応する上記

(1) 記載の抗体、

(3a)   配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるア

ミノ酸配列を含有するペプチドに対して中和活性を有する上記（３）記載の抗体、

5      （４） 配列番号：４、配列番号：５、配列番号：６、配列番号：７、配列番号：８、配列番号：９、配列番号：１０または配列番号：１１で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のＣ端側の部分ペプチドを認識しない上記（１）記載の抗体、

10      （５） 配列番号：４、配列番号：５、配列番号：６、配列番号：７、配列番号：８、配列番号：９、配列番号：１０または配列番号：１１で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドに対して中和活性を有する上記（１）記載の抗体、

10      （６） 標識化された上記（１）記載の抗体、

          （７） モノクローナル抗体である上記（１）記載の抗体、

          （８） AhW23N2G6D1（FERM BP-8363）で標示されるハイブリドーマ細胞から産生され得るAhW23N2G6D1aで標示される上記（７）記載の抗体、

15      （９） 上記（８）記載の抗体の、配列番号：４、配列番号：５、配列番号：６、配列番号：７、配列番号：８、配列番号：９、配列番号：１０または配列番号：１１で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対する結合部位に特異的に反応する抗体、

20      （１０） 配列番号：４、配列番号：５、配列番号：６、配列番号：７、配列番号：８、配列番号：９、配列番号：１０または配列番号：１１で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対して中和活性を有する上記（９）記載の抗体、

25      （１１） AhW23N3H3E4（FERM BP-8364）で標示されるハイブリドーマ細胞から産生され得るAhW23N3H3E4aで標示される上記（７）記載の抗体、

          （１２） 上記（１１）記載の抗体の、配列番号：４、配列番号：５、配列番号：６、配列番号：７、配列番号：８、配列番号：９、配列番号：１０または配列番号：１１で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対する結合部位に特異的に反応する抗体、

(13) 配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対して中和活性を有する上記(12)記載の抗体、

5 (14) 配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のC端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体、

(15) 配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列の第11～23番目のアミノ酸配列を有するペプチド  
10 に特異的に反応する上記(14)記載の抗体、

(15a) 配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドに対して中和活性を有する上記(15)記載の抗体、

(16) 配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10  
15 で表されるアミノ酸配列の第16～23番目、第17～23番目、第18～23番目、第19～23番目、第20～23番目、第21～23番目、第16～22番目、第17～22番目、第18～22番目、第19～22番目、第20～22番目、第16～21番目、第17～21番目、第18～21番目、第19～21番目、第16～20番目、第17～20番目および第18～20番目  
20 のアミノ酸配列から選ばれる少なくともひとつを含有するペプチドに特異的に反応する上記(14)記載の抗体、

(16a) 配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドに対して中和活性を有する上記(16)記載の抗体、

25 (17) 配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のN端側の部分ペプチドを認識しない上記(14)記載の抗体、

(18) 配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドに対して中和活性を有する上記

(14) 記載の抗体、

(19) 標識化された上記(14)記載の抗体、

(20) モノクローナル抗体である上記(14)記載の抗体、

5 (21) AhW23C6G1H8 (FERM BP-8365) で標示されるハイブリドーマ細胞から産生され得るAhW23C6G1H8aで標示される上記(20)記載の抗体、

(22) 上記(21)記載の抗体の、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対する結合部位に特異的に反応する抗体、

10 (23) 配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対して中和活性を有する上記(22)記載の抗体、

(24) AhW23C5G2F6 (FERM BP-8366) で標示されるハイブリドーマ細胞から産生され得るAhW23C5G2F6aで標示される  
15 上記(20)記載の抗体、

(25) 上記(24)記載の抗体の、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対する結合部位に特異的に反応する抗体、

20 (26) 配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対して中和活性を有する上記(25)記載の抗体、

(27) 配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のC端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体、

25 (28) 配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列の第16～30番目のアミノ酸配列を有するペプチドに特異的に反応する上記(27)記載の抗体、

(28a) 配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドに対して中和活性を有する上記

(28) 記載の抗体、

5 (29) 配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11  
で表されるアミノ酸配列の第23～30番目、第24～30番目、第25～30  
番目、第26～30番目、第27～30番目、第28～30番目、第23～  
29番目、第24～29番目、第25～29番目、第26～29番目、第27  
～29番目、第23～28番目、第24～28番目、第25～28番目、第2  
6～28番目、第23～27番目、第24～27番目および第25～27番目  
のアミノ酸配列から選ばれる少なくともひとつを含有するペプチドに特異的に  
反応する上記(27)記載の抗体、

10 (29a) 配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：1  
1で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドに対して中和活性を有する上記  
(29)記載の抗体、

15 (30) 配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11  
で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のN端側の部分  
ペプチドを認識しない上記(27)記載の抗体、

(31) 配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11  
で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドに対して中和活性を有する上記  
(27)記載の抗体、

(32) 標識化された上記(27)記載の抗体、

20 (33) モノクローナル抗体である上記(27)記載の抗体、

(34) ArW30C3A1A (FERM BP-8367) で標示される  
ハイブリドーマ細胞から産生され得るArW30C3A1Aaで標示される上  
記(33)記載の抗体、

25 (35) 上記(34)記載の抗体の、配列番号：5、配列番号：7、配列番  
号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチド  
に対する結合部位に特異的に反応する抗体、

(36) 配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11  
で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対して中和活性を有する上  
記(35)記載の抗体、

(37) ArW30C7F2E8 (FERM BP-8368) で標示されるハイブリドーマ細胞から産生され得るArW30C7F2E8aで標示される上記(33)記載の抗体、

5 (38) 上記(37)記載の抗体の、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対する結合部位に特異的に反応する抗体、

(39) 配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対して中和活性を有する上記(38)記載の抗体、

10 (40) 上記(1)、(14)または(27)記載の抗体を含有してなる医薬、

(41) 不妊症、腎性浮腫、消化性潰瘍または胃酸過多症の予防・治療剤である上記(40)記載の医薬、

15 (42) 上記(1)、(14)および/または(27)記載の抗体を含有してなる診断薬、

(43) 上記(1)記載の抗体を用いることを特徴とする配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の定量法、

20 (44) さらに上記(14)または(27)記載の抗体を用いることを特徴とする上記(43)記載の定量法、

(45) 上記(14)記載の抗体を用いることを特徴とする配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の定量法、

25 (46) 上記(27)記載の抗体を用いることを特徴とする配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の定量法、

(47) 上記(1)記載の抗体と、被検液および標識化された配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、



配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩とを競合的に反応させ、上記抗体に結合した上記標識化されたポリペプチドまたはその塩の割合を測定することを特徴とする、被検液中の配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の定量法、

(48) 上記(14)記載の抗体と、被検液および標識化された配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩とを競合的に反応させ、上記抗体に結合した上記標識化されたポリペプチドまたはその塩の割合を測定することを特徴とする、被検液中の配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の定量法、

(49) 上記(27)記載の抗体と、被検液および標識化された配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩とを競合的に反応させ、上記抗体に結合した上記標識化されたポリペプチドまたはその塩の割合を測定することを特徴とする、被検液中の配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の定量法、

(50) 1) 担体上に不溶化した上記(1)記載の抗体、標識化された上記(14)記載の抗体および被検液を反応させた後、標識剤の活性を測定する、または2) 担体上に不溶化した上記(14)記載の抗体、標識化された上記(1)記載の抗体および被検液を反応させた後、標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の定量法、

(51) 1) 担体上に不溶化した上記(1)記載の抗体、標識化された上記(27)記載の抗体および被検液を反応させた後、標識剤の活性を測定する、

または2)担体上に不溶化した上記(27)記載の抗体、標識化された上記

(1)記載の抗体および被検液を反応させた後、標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9または配列番号:11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の  
5 定量法、

(52) 上記(1)記載の抗体を用いることを特徴とする配列番号:4、配列番号:5、配列番号:6、配列番号:7、配列番号:8、配列番号:9、配列番号:10または配列番号:11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩が関与する疾患の診断法、

10 (53) さらに上記(14)または(27)記載の抗体を用いることを特徴とする上記(52)記載の診断法、

(54) 上記(14)記載の抗体を用いることを特徴とする配列番号:4、配列番号:6、配列番号:8または配列番号:10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩が関与する疾患の診断法、

15 (55) 上記(27)記載の抗体を用いることを特徴とする配列番号:5、配列番号:7、配列番号:9または配列番号:11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩が関与する疾患の診断法、

(56) 疾患が、不妊症、腎性浮腫、消化性潰瘍または胃酸過多症である、上記(52)～(55)記載の診断法、

20 (57) 上記(7)記載の抗体を産生するハイブリドーマ細胞、

(58) AhW23N2G6D1(FERM BP-8363)またはAhW23N3H3E4(FERM BP-8364)で標示される上記(57)記載のハイブリドーマ細胞、

(59) 上記(58)記載のハイブリドーマ細胞を生体内又は生体外で培養し、その体液または培養物から上記(7)記載の抗体を採取することを特徴とする上記(7)記載の抗体の製造法、  
25

(60) 上記(20)記載の抗体を産生するハイブリドーマ細胞、

(61) AhW23C6G1H8(FERM BP-8365)またはAhW23C5G2F6(FERM BP-8366)で標示される上記(60)

記載のハイブリドーマ細胞、

(62) 上記(61)記載のハイブリドーマ細胞を生体内又は生体外で培養し、その体液または培養物から上記(20)記載の抗体を採取することを特徴とする上記(20)記載の抗体の製造法、

5 (63) 上記(33)記載の抗体を産生するハイブリドーマ細胞、

(64) ArW30C3A1A (FERM BP-8367) または ArW30C7F2E8 (FERM BP-8368) で標示される上記(63)記載のハイブリドーマ細胞、

10 (65) 上記(64)記載のハイブリドーマ細胞を生体内又は生体外で培養し、その体液または培養物から上記(33)記載のモノクローナル抗体を採取することを特徴とする上記(33)記載の抗体の製造法、

(66) 哺乳動物に対し、上記(1)、(14)または(27)記載の抗体の有効量を投与することを特徴とする不妊症、腎性浮腫、消化性潰瘍または胃酸過多症の予防・治療法、

15 (67) 不妊症、腎性浮腫、消化性潰瘍または胃酸過多症の予防・治療剤を製造するための上記(1)、(14)または(27)記載の抗体の使用などに関する。

#### 図面の簡単な説明

20 図1は、モノクローナル抗体2G6-D1とビオチン標識化peptide-1との結合に対するpeptide-1、ヒトNPW23またはヒトNPW30による結合阻害を示す。図中、-○-はpeptide-1を添加した場合を、-□-はヒトNPW23を添加した場合を、-△-はヒトNPW30を添加した場合をそれぞれ示す。

25 図2は、モノクローナル抗体3H3-E4とビオチン標識化peptide-1との結合に対するpeptide-1、ヒトNPW23またはヒトNPW30による結合阻害を示す。図中、-○-はpeptide-1を添加した場合を、-□-はヒトNPW23を添加した場合を、-△-はヒトNPW30を添加した場合をそれぞれ示す。

図3は、モノクローナル抗体5E6-C3とビオチン標識化peptide-1との結合に対するpeptide-1、ヒトNPW23またはヒトNPW30による結合阻害を示す。図中、-○-

—はpeptide-1を添加した場合を、—□—はヒトNPW23を添加した場合を、—△—はヒトNPW30を添加した場合をそれぞれ示す。

図4は、モノクローナル抗体7F9-E12とビオチン標識化peptide-1との結合に対するpeptide-1、ヒトNPW23またはヒトNPW30による結合阻害を示す。図中、—  
5 ○—はpeptide-1を添加した場合を、—□—はヒトNPW23を添加した場合を、—△—はヒトNPW30を添加した場合をそれぞれ示す。

図5は、モノクローナル抗体2F1B2Aとビオチン標識化peptide-2との結合に対するpeptide-2、ヒトNPW23またはヒトNPW30による結合阻害を示す。図中、—○—  
10 —はpeptide-2を添加した場合を、—□—はヒトNPW23を添加した場合を、—△—はヒトNPW30を添加した場合をそれぞれ示す。

図6は、モノクローナル抗体5A2Aとビオチン標識化peptide-2との結合に対するpeptide-2、ヒトNPW23またはヒトNPW30による結合阻害を示す。図中、—○—  
—はpeptide-2を添加した場合を、—□—はヒトNPW23を添加した場合を、—△—はヒトNPW30を添加した場合をそれぞれ示す。

15 図7は、モノクローナル抗体5D6-F10とビオチン標識化peptide-2との結合に対するpeptide-2、ヒトNPW23またはヒトNPW30による結合阻害を示す。図中、—○—はpeptide-2を添加した場合を、—□—はヒトNPW23を添加した場合を、—△—はヒトNPW30を添加した場合をそれぞれ示す。

図8は、モノクローナル抗体5G2-F6とビオチン標識化peptide-2との結合に対するpeptide-2、ヒトNPW23またはヒトNPW30による結合阻害を示す。図中、—○—  
20 —はpeptide-2を添加した場合を、—□—はヒトNPW23を添加した場合を、—△—はヒトNPW30を添加した場合をそれぞれ示す。

図9は、モノクローナル抗体6G1-H8とビオチン標識化peptide-2との結合に対するpeptide-2、ヒトNPW23またはヒトNPW30による結合阻害を示す。図中、—○—  
25 —はpeptide-2を添加した場合を、—□—はヒトNPW23を添加した場合を、—△—はヒトNPW30を添加した場合をそれぞれ示す。

図10は、モノクローナル抗体7B4-D2とビオチン標識化peptide-2との結合に対するpeptide-2、ヒトNPW23またはヒトNPW30による結合阻害を示す。図中、—○—  
—はpeptide-2を添加した場合を、—□—はヒトNPW23を添加した場合を、—

△-はヒトNPW30を添加した場合をそれぞれ示す。

図11は、モノクローナル抗体2A1Aとビオチン標識化peptide-3との結合に対するpeptide-3、ヒトNPW23またはヒトNPW30による結合阻害を示す。図中、-○-はpeptide-3を添加した場合を、-□-はヒトNPW23を添加した場合を、-△-はヒトNPW30を添加した場合をそれぞれ示す。

図12は、モノクローナル抗体3A1Aとビオチン標識化peptide-3との結合に対するpeptide-3、ヒトNPW23またはヒトNPW30による結合阻害を示す。図中、-○-はpeptide-3を添加した場合を、-□-はヒトNPW23を添加した場合を、-△-はヒトNPW30を添加した場合をそれぞれ示す。

図13は、モノクローナル抗体7F2-E8とビオチン標識化peptide-3との結合に対するpeptide-3、ヒトNPW23またはヒトNPW30による結合阻害を示す。図中、-○-はpeptide-3を添加した場合を、-□-はヒトNPW23を添加した場合を、-△-はヒトNPW30を添加した場合をそれぞれ示す。

図14は、NPWアミノ末端認識モノクローナル抗体によるヒトNPW23のcAMP合成阻害活性の抑制を示す。ヒトGPR7発現細胞に添加した場合を示す。

図15は、NPWアミノ末端認識モノクローナル抗体によるヒトNPW23のcAMP合成阻害活性の抑制を示す。ヒトGPR8発現細胞に添加した場合を示す。

図16は、NPWアミノ末端認識モノクローナル抗体によるラットNPW23のcAMP合成阻害活性の抑制を示す。

図17は、モノクローナル抗体2G6-D1によるラットNPW23およびラットNPW30のcAMP合成阻害活性の抑制を示す。図中、□はラットNPWのみを加えた場合を、■はラットNPWおよび2G6-D1抗体を加えた場合を示す。

図18は、NPW23カルボキシル末端認識モノクローナル抗体によるラットNPW23のcAMP合成阻害活性の抑制を示す。

図19は、NPW30カルボキシル末端認識モノクローナル抗体によるラットNPW30のcAMP合成阻害活性の抑制を示す。

図20は、モノクローナル抗体2F1B2Aを用いたEIA系に、種々の濃度のヒトNPW23およびラット（マウス）NPW23を添加した場合の450 nmにおける吸光度を示す。図中、-○-はヒトNPW23を添加した場合を、-□-はラット（マウス）

NPW23を添加した場合をそれぞれ示す。

図 2 1 は、モノクローナル抗体5A2Aを用いたEIA系に、種々の濃度のヒト NPW23およびラット（マウス） NPW23を添加した場合の450 nmにおける吸光度を示す。図中、－○－はヒトNPW23を添加した場合を、－□－はラット（マウス） NPW23を添加した場合をそれぞれ示す。

図 2 2 は、モノクローナル抗体5D6-F10を用いたEIA系に、種々の濃度のヒト NPW23およびラット（マウス） NPW23を添加した場合の450 nmにおける吸光度を示す。図中、－○－はヒトNPW23を添加した場合を、－□－はラット（マウス） NPW23を添加した場合をそれぞれ示す。

図 2 3 は、モノクローナル抗体5G2-F6を用いたEIA系に、種々の濃度のヒト NPW23およびラット（マウス） NPW23を添加した場合の450 nmにおける吸光度を示す。図中、－○－はヒトNPW23を添加した場合を、－□－はラット（マウス） NPW23を添加した場合をそれぞれ示す。

図 2 4 は、モノクローナル抗体6G1-H8を用いたEIA系に、種々の濃度のヒト NPW23およびラット（マウス） NPW23を添加した場合の450 nmにおける吸光度を示す。図中、－○－はヒトNPW23を添加した場合を、－□－はラット（マウス） NPW23を添加した場合をそれぞれ示す。

図 2 5 は、モノクローナル抗体7B4-D2を用いたEIA系に、種々の濃度のヒト NPW23およびラット（マウス） NPW23を添加した場合の450 nmにおける吸光度を示す。図中、－○－はヒトNPW23を添加した場合を、－□－はラット（マウス） NPW23を添加した場合をそれぞれ示す。

図 2 6 は、モノクローナル抗体2A1Aを用いたEIA系に、種々の濃度のヒト NPW30、ラットNPW30、マウスNPW30およびブタNPW30を添加した場合の450 nmにおける吸光度を示す。図中、－○－はヒトNPW30を添加した場合を、－□－はラットNPW30を添加した場合を、－△－はマウスNPW30を添加した場合を、－◇－はブタNPW30を添加した場合をそれぞれ示す。

図 2 7 は、モノクローナル抗体3A1Aを用いたEIA系に、種々の濃度のヒト NPW30、ラットNPW30、マウスNPW30およびブタNPW30を添加した場合の450 nmにおける吸光度を示す。図中、－○－はヒトNPW30を添加した場合を、－□－はラ

ットNPW30を添加した場合を、 $\triangle$ はマウスNPW30を添加した場合を、 $\diamond$ はブタNPW30を添加した場合をそれぞれ示す。

図28は、モノクローナル抗体7F2-E8を用いたEIA系に、種々の濃度のヒトNPW30、ラットNPW30、マウスNPW30およびブタNPW30を添加した場合の450 nmにおける吸光度を示す。図中、 $\circ$ はヒトNPW30を添加した場合を、 $\square$ はラットNPW30を添加した場合を、 $\triangle$ はマウスNPW30を添加した場合を、 $\diamond$ はブタNPW30を添加した場合をそれぞれ示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

- 10 本明細書におけるタンパク質（ポリペプチド）は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをはじめとする、本発明で用いられるタンパク質は、C末端がカルボキシル基、カルボキシレート、アミドまたはエステルの何れであってもよい。
- 15 配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドとしては、例えば、（1）配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列に数（1～5）個のアミノ酸が付
- 20 加したアミノ酸配列、（2）配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列に数（1～5）個のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、（3）配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミ
- 25 ノ酸配列中の数（1～5）個のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどが用いられる。

配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、

有機酸)や塩基(例、アルカリ金属など)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸(例、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、または有機酸(例、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。

配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のN端側の部分ペプチドとしては、例えば、

(a) 配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列の

- (i) 第1～3番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、
- (ii) 第1～4番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、
- (iii) 第1～5番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、
- (iv) 第1～6番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、
- (v) 第1～7番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、
- (vi) 第1～8番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、
- (vii) 第1～9番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、
- (viii) 第2～4番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、
- (ix) 第2～5番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、
- (x) 第2～6番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、
- (xi) 第2～7番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、
- (xii) 第2～8番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、
- (xiii) 第2～9番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、
- (xiv) 第3～5番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、
- (xv) 第3～6番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、
- (xvi) 第3～7番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、



- (xvii) 第3～8番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(xviii) 第3～9番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(xix) 第4～6番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(xx) 第4～7番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
5 (xxi) 第4～8番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(xxii) 第4～9番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(xxiii) 第5～7番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(xxiv) 第5～8番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(xxv) 第5～9番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
10 (xxvi) 第6～8番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(xxvii) 第6～9番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、ならびに  
(xxviii) 第7～9番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、および  
(b) 配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列の第1～5  
番目のアミノ酸配列を有するポリペプチドなどが挙げられる。
- 15 配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表され  
るアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のC端側の部分ペプチド  
としては、例えば、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番  
号：10で表されるアミノ酸配列の、  
(i) 第16～23番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
20 (ii) 第17～23番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(iii) 第18～23番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(iv) 第19～23番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(v) 第20～23番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(vi) 第21～23番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
25 (vii) 第16～22番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(viii) 第17～22番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(ix) 第18～22番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(x) 第19～22番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(xi) 第20～22番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、

- (xii) 第16～21番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(xiii) 第17～21番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(xiv) 第18～21番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(xv) 第19～21番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
5 (xvi) 第16～20番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(xvii) 第17～20番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、および  
(xviii) 第18～20番目のアミノ酸配列を有するポリペプチドなどが挙げられる。

10 配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のC端側の部分ペプチドとしては、例えば、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列の、

- (i) 第23～30番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(ii) 第24～30番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
15 (iii) 第25～30番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(iv) 第26～30番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(v) 第27～30番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(vi) 第28～30番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(vii) 第23～29番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
20 (viii) 第24～29番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(ix) 第25～29番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(x) 第26～29番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(xi) 第27～29番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(xii) 第23～28番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
25 (xiii) 第24～28番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(xiv) 第25～28番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(xv) 第26～28番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(xvi) 第23～27番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
(xvii) 第24～27番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド、および

(xviii) 第25～27番目のアミノ酸配列を有するポリペプチドなどが挙げられる。

配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、  
配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列  
5 含有するポリペプチドまたはその塩のN端側の部分ペプチドに特異的に反応  
する抗体としては、例えば該ポリペプチドまたはその塩のN端側の部分ペプチ  
ドに特異的に反応するものであればよく、好ましくはモノクローナル抗体が挙  
げられる。具体的には、配列番号：4で表されるアミノ酸配列の第1～13番  
目までのアミノ酸配列を含むペプチド、配列番号：4で表されるアミノ酸配列  
10 の第1～13番目までのアミノ酸配列を有し、かつこのアミノ酸配列の第14  
番目をCys-NH<sub>2</sub>に置換したアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異的に反応す  
る抗体（好ましくは、モノクローナル抗体）などが用いられる。

このうち好ましくは、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番  
号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11  
15 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のC端側の部分  
ペプチドを認識しないものである。

さらに好ましくは、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番  
号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11  
20 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の活性を中和す  
る抗体である。

具体的には、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、  
配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表され  
るアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩に対して1～1000倍、  
好ましくは1～100倍、さらに好ましくは1～10倍のモル比で添加した際  
25 に、上記ポリペプチドまたはその塩の活性〔例、ヒトGPR8、ヒトGPR7、  
ラットGPR7またはマウスGPR7を発現する細胞に対する細胞刺激活性

（例、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内c  
AMP生成および抑制、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞  
膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、G

TP $\gamma$ S結合活性などを促進する活性など) など] を10%以上、好ましくは50%以上、さらに好ましくは80%以上抑制する抗体などである。

好ましい具体例としては、AhW23N2G6D1aで標示されるモノクローナル抗体、AhW23N3H3E4aで標示されるモノクローナル抗体などが挙げられる。

さらに、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のN端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体としては、(a) 配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列の (i) 第1～3番目のアミノ酸配列、(ii) 第1～4番目のアミノ酸配列、(iii) 第1～5番目のアミノ酸配列、(iv) 第1～6番目のアミノ酸配列、(v) 第1～7番目のアミノ酸配列、(vi) 第1～8番目のアミノ酸配列、(vii) 第1～9番目のアミノ酸配列、(viii) 第2～4番目のアミノ酸配列、(ix) 第2～5番目のアミノ酸配列、(x) 第2～6番目のアミノ酸配列、(xi) 第2～7番目のアミノ酸配列、(xii) 第2～8番目のアミノ酸配列、(xiii) 第2～9番目のアミノ酸配列、(xiv) 第3～5番目のアミノ酸配列、(xv) 第3～6番目のアミノ酸配列、(xvi) 第3～7番目のアミノ酸配列、(xvii) 第3～8番目のアミノ酸配列、(xviii) 第3～9番目のアミノ酸配列、(xix) 第4～6番目のアミノ酸配列、(xx) 第4～7番目のアミノ酸配列、(xxi) 第4～8番目のアミノ酸配列、(xxii) 第4～9番目のアミノ酸配列、(xxiii) 第5～7番目のアミノ酸配列、(xxiv) 第5～8番目のアミノ酸配列、(xxv) 第5～9番目のアミノ酸配列、(xxvi) 第6～8番目のアミノ酸配列、(xxvii) 第6～9番目のアミノ酸配列もしくは (xxviii) 第7～9番目のアミノ酸配列、または (b) 配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列の第1～5番目のアミノ酸配列を特異的に認識する抗体などが用いられる。

また、AhW23N2G6D1aで標示されるモノクローナル抗体またはAhW23N3H3E4aで標示されるモノクローナル抗体の、配列番号：4、

配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対する結合部位に特異的に反応する抗体（例、モノクローナル抗体）も、本発明に含まれる。中でも、上記ポリペプチドに対して中和活性を有する抗体（例、モノクローナル抗体）である。

上記「結合部位」としては、AhW23N2G6D1aで標示されるモノクローナル抗体またはAhW23N3H3E4aで標示されるモノクローナル抗体が結合する部位であればよく、好ましくは、特異的に結合する部位、エピトープである。

10 配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のC端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体は、例えば、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のC端側の部分ペプチドに特異的に反応するものであればよく、  
15 好ましくはモノクローナル抗体が挙げられる。

具体的には、例えば、配列番号：4で表されるアミノ酸配列の第11～23番目までのアミノ酸配列を含むペプチド、配列番号：4で表されるアミノ酸配列の第11～23番目までのアミノ酸配列を有し、かつこのアミノ酸配列の第11番目にCysを付加したアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異的に反応する抗体（好ましくは、モノクローナル抗体）などが用いられる。

このうち好ましくは、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のN端側の部分ペプチドを認識しないものである。

さらに好ましくは、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の活性を中和する抗体である。

具体的には、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩に対して1～1000倍、好ましくは1～100倍、さらに好ましくは1～10倍のモル

比で添加した際に、上記ポリペプチドまたはその塩の活性〔例、ヒトGPR8、ヒトGPR7、ラットGPR7またはマウスGPR7を発現する細胞に対する細胞刺激活性（例、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成および抑制、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTPγS結合活性などを促進する活性など）など〕を10%以上、好ましくは50%以上、さらに好ましくは80%以上抑制する抗体などである。

5 好ましい具体例としては、AhW23N2G6D1aで標示されるモノクローナル抗体、AhW23N3H3E4aで標示されるモノクローナル抗体などが挙げられる。

さらに、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のC端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体としては、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列の、(i) 第16～23番目のアミノ酸配列、(ii) 第17～23番目のアミノ酸配列、(iii) 第18～23番目のアミノ酸配列、(iv) 第19～23番目のアミノ酸配列、(v) 第20～23番目のアミノ酸配列、(vi) 第21～23番目のアミノ酸配列、(vii) 第16～22番目のアミノ酸配列、(viii) 第17～22番目のアミノ酸配列、(ix) 第18～22番目のアミノ酸配列、(x) 第19～22番目のアミノ酸配列、(xi) 第20～22番目のアミノ酸配列、(xii) 第16～21番目のアミノ酸配列、(xiii) 第17～21番目のアミノ酸配列、(xiv) 第18～21番目のアミノ酸配列、(xv) 第19～21番目のアミノ酸配列、(xvi) 第16～20番目のアミノ酸配列、(xvii) 第17～20番目のアミノ酸配列または(xviii) 第18～20番目のアミノ酸配列を特異的に認識する抗体などが用いられる。

25 また、AhW23N2G6D1aで標示されるモノクローナル抗体またはAhW23N3H3E4aで標示されるモノクローナル抗体の、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対する結合部位に特異的に反応する抗体（例、モノク

ローナル抗体)も、本発明に含まれる。中でも、上記ポリペプチドに対して中和活性を有する抗体(例、モノクローナル抗体)である。

上記「結合部位」としては、AhW23N2G6D1aで標示されるモノクローナル抗体またはAhW23N3H3E4aで標示されるモノクローナル抗体が結合する部位であればよく、好ましくは、特異的に結合する部位、エピトープである。

配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のC端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体は、例えば、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のC端側の部分ペプチドに特異的に反応するものであればよく、好ましくはモノクローナル抗体が挙げられる。

具体的には、例えば、配列番号：7で表されるアミノ酸配列の第16～30番目までのアミノ酸配列を含むペプチド、配列番号：7で表されるアミノ酸配列の第16～30番目までのアミノ酸配列を有し、かつこのアミノ酸配列の第16番目にCysを付加したアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異的に反応する抗体(好ましくは、モノクローナル抗体)などが用いられる。

このうち好ましくは、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のN端側の部分ペプチドを認識しないものである。

さらに好ましくは、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の活性を中和する抗体である。

具体的には、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩に対して1～1000倍、好ましくは1～100倍、さらに好ましくは1～10倍のモル比で添加した際に、上記ポリペプチドまたはその塩の活性〔例、ヒトGPR8、ヒトGPR7、ラットGPR7またはマウスGPR7を発現する細胞に対する細胞刺激活性(例、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊

離、細胞内 cAMP 生成および抑制、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下、GTP  $\gamma$  S 結合活性などを促進する活性など) など] を 10% 以上、好ましくは 50% 以上、さらに好ましくは 80% 以上抑制する抗体などである。

- 5 好ましい具体例としては、ArW30C3A1Aa で標示されるで標示されるモノクローナル抗体、ArW30C7F2E8 で標示されるモノクローナル抗体などが挙げられる。

- さらに、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9 または配列番号：11 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の C 端側の部分
- 10 ペプチドに特異的に反応する抗体としては、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9 または配列番号：11 で表されるアミノ酸配列の、(i) 第 23～30 番目のアミノ酸配列、(ii) 第 24～30 番目のアミノ酸配列、(iii) 第 25～30 番目のアミノ酸配列、(iv) 第 26～30 番目のアミノ酸配列、(v) 第 27～30 番目のアミノ酸配列、(vi) 第 28～30 番目のアミノ酸配列、
- 15 (vii) 第 23～29 番目のアミノ酸配列、(viii) 第 24～29 番目のアミノ酸配列、(ix) 第 25～29 番目のアミノ酸配列、(x) 第 26～29 番目のアミノ酸配列、(xi) 第 27～29 番目のアミノ酸配列、(xii) 第 23～28 番目のアミノ酸配列、(xiii) 第 24～28 番目のアミノ酸配列、(xiv) 第 25～28 番目のアミノ酸配列、(xv) 第 26～28 番目のアミノ酸配列、(xvi) 第 23～27 番目のアミノ酸配列、(xvii) 第 24～27 番目のアミノ酸配列
- 20 または (xviii) 第 25～27 番目のアミノ酸配列を特異的に認識する抗体などが用いられる。

- また、ArW30C3A1Aa で標示されるモノクローナル抗体または ArW30C7F2E8 で標示されるモノクローナル抗体の、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9 または配列番号：11 で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対する結合部位に特異的に反応する抗体 (例、モノクローナル抗体) も、本発明に含まれる。中でも、上記ポリペプチドに対して中和活性を有する抗体 (例、モノクローナル抗体) である。
- 25

上記「結合部位」としては、ArW30C3A1Aa で標示されるモノクロ



ーナル抗体またはA r W 3 0 C 7 F 2 E 8で標示されるモノクローナル抗体が結合する部位であればよく、好ましくは、特異的に結合する部位、エピトープである。

- 5       以下に、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のN端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のC  
10       端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体、および配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のC端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体（以下、これらを合わせて本発明の抗体と称することもある）の抗原の調製法、および該抗体の製造法について説明する。

15       (1) 抗原の調製

- 本発明の抗体を調製するために使用される抗原としては、例えば、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩（以下、NPWと称することもある）と同一の抗原  
20       決定基を1種または2種以上有する合成ペプチドなど何れのものも使用することができる（以下、これらを単にNPW抗原と称することもある）。

- NPWは、(a) 例えばヒト、サル、ラット、マウスなどの哺乳動物の組織または細胞から公知の方法あるいはそれに準ずる方法を用いて調製、(b) ペプチド・シンセサイザー等を使用する公知のペプチド合成方法で化学的に合成、  
25       (c) NPWをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造される。

      (a) 該哺乳動物の組織または細胞からNPW抗原を調製する場合、その組織または細胞をホモジナイズした後、酸、またはアルコールなどで抽出を行い、該抽出液を、塩析、透析、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマ

トグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

(b) 化学的にNPW抗原を調製する場合、該合成ペプチドとしては、例えば上述した天然より精製したNPW抗原と同一の構造を有するもの、配列番号：4で表されるアミノ酸配列において3個以上、好ましくは8個以上のアミノ酸からなる任意の箇所のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を1種あるいは2種以上含有するペプチドなどが用いられる。

(c) DNAを含有する形質転換体を用いてNPWを製造する場合、該DNAは、公知のクローニング方法〔例、Molecular Cloning (2nd ed. ; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法など〕に従って作成することができる。該クローニング方法とは、(1) NPWのアミノ酸配列に基づきデザインしたDNAプローブまたはDNAプライマーを用い、cDNAライブラリーからハイブリダイゼーション法によりNPWをコードするDNAを含有する形質転換体を得る方法、または(2) NPWのアミノ酸配列に基づきデザインしたDNAプライマーを用い、PCR法によりNPWをコードするDNAを含有する形質転換体を得る方法などが挙げられる。

NPW抗原としてのペプチドは、(1) 公知のペプチドの合成法に従って、または(2) 配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドを適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。

該ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、該ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としてはたとえば、以下の(i)～(ii)に記載された方法等が挙げられる。

(i) Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966年)

(ii) The Peptide, Academic Press, New York (1965年)

また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶などを組み合わせて該ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

ペプチドのアミド体は、アミド形成に適した市販のペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げるることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするペプチドの配列通りに、公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、目的のペプチドを取得する。あるいはクロロトリチル樹脂、オキシム樹脂、4-ヒドロキシ安息香酸系樹脂等を用い、部分的に保護したペプチドを取り出し、更に常套手段で保護基を除去し目的のペプチドを得ることもできる。

上記した保護されたアミノ酸の縮合に関しては、ペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としてはDCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが挙げられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、HOBt、HOObtなど)とともに保護されたアミノ酸を直接樹脂に添加するか、または、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護されたアミノ酸の活性化を行ったのちに樹脂に添加することができる。保護されたアミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド縮合反応に使用しうるということが知られている溶媒から適宜選択されうる。

たとえばN, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジンなどの三級アミン類、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20~約50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常約1.5~約4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化して、後の反応に影響を及ぼさないようにすることができる。

原料アミノ酸のアミノ基の保護基としては、たとえば、Z、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが挙げられる。カルボキシ基の保護基としては、たとえばC<sub>1-6</sub>アルキル基、C<sub>3-8</sub>シクロアルキル基、C<sub>7-14</sub>アラルキル基、2-アダマンチル、4-ニトロベンジル、4-メトキシベンジル、4-クロロベンジル、フェナシルおよびベンジルオキシカルボニルヒドラジド、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド、トリチルヒドラジドなどが挙げられる。

セリンおよびスレオニンの水酸基は、たとえばエステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては例えばアセチル基などの低級(C<sub>1-6</sub>)アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが挙げられる。また、エーテル化に適する基としては、たとえばベン

ジル基、テトラヒドロピラニル基、ターシャリーブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、たとえばBz 1、C1-Bz 1、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが挙げられる。

- 5 ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、Tos、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、Bom、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが挙げられる。

- 原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、たとえば対応する酸無水物、アジド、活性エステル [アルコール (たとえば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt) とのエステル] などが挙げられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、たとえば対応するリン酸アミドが挙げられる。

- 15 保護基の除去 (脱離) 方法としては、たとえばPd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども挙げられる。上記酸処理による脱離反応は一般に-20~40℃の温度で行われるが、酸処理においてはアニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として、
- 20 用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。
- 25

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護および保護基、ならびにその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基あるいは公知の手段から適宜選択しうる。

5      ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、まず、カルボキシル末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いたペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除いたペプチド（またはアミノ酸）とを製造し、この両ペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた  
10    保護ペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ペプチドを得ることができる。この粗ペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のペプチドのアミド体を得ることができる。

15    ペプチドのエステル体を得るにはカルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ペプチドのアミド体と同様にして所望のペプチドのエステル体を得ることができる。

NPW抗原は、不溶化したものを直接免疫することもできる。また、NPW抗原を適当な担体に結合または吸着させた複合体を免疫してもよい。該担体（キャリアー）とNPW抗原（ハプテン）との混合比は、担体に結合または吸着させたNPW  
20    抗原に対して抗体が効率よくできれば、どのようなものをどのような比率で結合あるいは吸着させてもよく、通常ハプテン抗原に対する抗体の作製にあたり常用されている天然もしくは合成の高分子担体を重量比でハプテン1に対し0.1～100の割合で結合あるいは吸着させたものを使用することができる。天然の高分子担体としては、例えばウシ、ウサギ、ヒトなどの哺乳動物の血清アルブミンや例えばウシ、ウサギなどの哺乳動物のチログロブリン、例えばウシ、  
25    ウサギ、ヒト、ヒツジなどの哺乳動物のヘモグロビン、キーホールリンペットヘモシアニンなどが用いられる。合成の高分子担体としては、例えばポリアミノ酸類、ポリスチレン類、ポリアクリル類、ポリビニル類、ポリプロピレン類などの重合物または供重合物などの各種ラテックスなどを用いることができる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができる。例えば、チロシン、ヒスチジン、トリプトファンを架橋するビスジアゾ化ベンジジンなどのジアゾニウム化合物、アミノ基同志を架橋するグルタルアルデヒドなどのジアルデヒド化合物、トルエン-2, 4-ジイソシアネートなどのジイソシアネート化合物、チオール基同志を架橋するN, N'-o-フェニレンジマレイミドなどのジマレイミド化合物、アミノ基とチオール基を架橋するマレイミド活性エステル化合物、アミノ基とカルボキシル基とを架橋するカルボジイミド化合物などが好都合に用いられる。また、アミノ基同志を架橋する際にも、一方のアミノ基にジチオピリジル基を有する活性エステル試薬（例えば、SPDPなど）を反応させた後還元することによりチオール基を導入し、他方のアミノ基にマレイミド活性エステル試薬によりマレイミド基を導入後、両者を反応させることもできる。

## (2) モノクローナル抗体の作製

NPW抗原は、温血動物に対して、例えば腹腔内注入、静脈注入、皮下注射などの投与方法によって、抗体産生が可能な部位にそれ自体単独であるいは担体、希釈剤と共に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常2~6週毎に1回ずつ、計2~10回程度行われる。温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリなどがあげられるが、モノクローナル抗体作製にはマウスが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体の作製に際しては、NPW抗原を免疫された温血動物、たとえばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2~5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、抗NPWモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。血清中の抗NPW抗体価の測定は、例えば後記の標識化NPWと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方法〔Nature、256巻、495頁（1975年）〕に従い実施できる。融合促進剤としては、ポリエチ

レングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGなどが用いられる。骨髓腫細胞としてはたとえばNS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などがあげられるが、P3U1などが好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞 (脾臓細胞) 数と骨髓細胞数との好ましい比率は、通常1:1~20:1程度であり、PEG (好ましくはPEG1000~PEG6000) が10~80%程度の濃度で添加され、通常20~40℃、好ましくは30~37℃で、通常1~10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

抗NPW抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えばNPWまたはその部分ペプチドを直接あるいは担体とともに吸着させた固相 (例、マイクロプレート) にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体 (細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる) またはプロテインAを加え、固相に結合した抗NPWモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したNPWを加え、固相に結合したNPWモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。抗NPWモノクローナル抗体のスクリーニング、育種は通常HAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン) を添加して、10~20%牛胎児血清を含む動物細胞用培地 (例、RPMI1640) で行われる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗NPW抗体価の測定と同様にして測定できる。

抗NPWモノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法 [例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体 (例、DEAE) による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法など] に従って行われる。

以上のようにして、ハイブリドーマ細胞を温血動物の生体内又は生体外で培養し、その体液または培養物から抗体を採取することによって、本発明の抗体



を製造することができる。

なお、NPWの一部領域と反応する抗NPW抗体を産生するハイブリドーマおよび、NPWとは反応するがその一部領域とは反応しない抗NPWモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングは、たとえばその一部領域に相当するペプチドとハイブリドーマが産生する抗体との結合性を測定することにより行うことができる。

〔1〕本発明の抗体を用いるNPWの定量法およびNPWの関与する疾患の診断法  
NPWの定量法（免疫測定法等）について、以下に述べる。

10 本発明の抗体を用いることにより、NPWの測定または組織染色などによる検出を行なうことができる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また抗体分子のF(ab')<sub>2</sub>、Fab'またはFab画分などを用いてもよい。

本発明の抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、NPW量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、サンドイッチ法、競合法、イムノメトリック法、ネフロメトリーなどが用いられるが、感度、特異性の点で後述するサンドイッチ法、競合法が、特にサンドイッチ法が好ましい。

20 (1) サンドイッチ法

担体上に不溶化した本発明の抗体、標識化された本発明の抗体および被検液を反応させた後、標識剤の活性を測定することにより被検液中のNPWを定量する。好ましくは、

(i) 担体上に不溶化したNPWのN端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体、  
25 標識化されたNPWのC端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体および被検液を反応させた後、標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中のNPWの定量法、

(ii) 担体上に不溶化したNPWのC端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体、  
標識化されたNPWのN端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体および被検液

を反応させた後、標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中のNPWの定量法などが挙げられる。

さらに好ましくは、NPWのN端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体が、AhW23N2G6D1aで標示されるモノクローナル抗体またはAhW23N3H3E4aで標示されるモノクローナル抗体で、NPWのC端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体が、(a) AhW23C6G1H8aで標示されるモノクローナル抗体もしくはAhW23C5G2F6aで標示されるモノクローナル抗体、または(b) ArW30C3A1Aaで標示されるモノクローナル抗体もしくはArW30C7F2E8aで標示されるモノクローナル抗体である定量法である。これらの抗体は、例えば西洋ワサビパーオキシダーゼ

(horseradish peroxidase ; HRP) で標識化されて用いられるのが好ましい。

サンドイッチ法においては、不溶化した本発明の抗体に被検液を反応(1次反応)させ、さらに標識化された本発明の抗体を反応(2次反応)させた後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中のNPW量を定量することができる。1次反応と2次反応は同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体または標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。サンドイッチ法によるNPWの測定法においては、例えば、1次反応で用いられる抗体がNPWのC端側の部分ペプチドを認識する場合は、2次反応で用いられる抗体はC端側の部分ペプチド以外(即ち、N端側)を認識する抗体が好ましく、1次反応で用いられる抗体がNPWのN端側の部分ペプチドを認識する場合は、2次反応で用いられる抗体は、N端側の部分ペプチド以外(即ち、C端側)を認識する抗体が好ましく用いられる。

## (2) 競合法

本発明の抗体、被検液および標識化されたNPWとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化されたNPWの割合を測定することにより、被検液中のNPWを定量する。

本反応法は、例えば、固相化法を用いて行う。

具体例としては、抗マウスIgG抗体（ICN/CAPPEL社製）を固相化抗体として用い、この固相化抗体の存在するプレートに、i) 本発明の抗体（例、AhW23N2G6D1a、AhW23N3H3E4a、AhW23C6G1H8a、AhW23C5G2F6a、ArW30C3A1Aa、ArW30C7F2E8aなど）、ii) horseradish peroxidase（HRP）で標識化されたNPW、およびiii) 被検液を添加し、反応後、固相に吸着したHRP活性を測定し、NPWを  
5 定量する。

### （３）イムノメトリック法

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化された本発明の抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、ある  
10 いは被検液中の抗原と過剰量の標識化された本発明の抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化された本発明の抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

### （４）ネフロメトリー

15 ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

上記（１）～（４）において、標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤  
20 としては、標識剤としては、例えば、放射性同位元素（例、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{32}\text{P}]$ 、 $[^{33}\text{P}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$  など）、蛍光物質〔例、シアニン蛍光色素（例、Cy2、Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7（アマシャムバイオサイエンス社製）など）、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなど〕、酵素（例、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素など）、発光物質（例、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなど）、ピオチン、ランタニド元素などが用いられる。さらに、抗体と標識剤との結合にピオチン-アピジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常

タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えばアガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、例えばポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコンなどの合成樹脂あるいはガラスなどが挙げられる。

- 5        これら個々の免疫学的測定法を本発明法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えてNPWの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)など参照]。したがって、本発明のサンドイッチ免疫測定法によりNPWの測定系を構築する場合、その方法は後述する実施例に限定されない。
- 10        以上のように、本発明の抗体は、NPWを感度良く定量することができるので、NPWのさらなる生理機能の解明およびNPWの関与する疾患の診断に有用である。
- 15        例えば、本発明の抗体を用いて、体液中(血液、血漿、血清、尿、卵胞液、脊髄液、精液など)に含まれるNPWの量を測定することにより、NPWが関与する疾患〔例、拒食症、肥満症(例、悪性肥満細胞症、外因性肥満、過インシュリン性肥満症、過血漿性肥満、下垂体性肥満、減血漿性肥満症、甲状腺機能低下肥満症、視床下部性肥満、症候性肥満症、小児肥満、上半身肥満、食事性肥満
- 20
- 25

- 症、性機能低下性肥満、全身性肥満細胞症、単純性肥満、中心性肥満など）、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル症候群、アルゴンツ・デル・カスティロ症候群、フォーベス・アルブライト症候群、リンパ腫、シーハン症候群、精子形成異常、腎性浮腫、尿排出障害（例、膀胱収縮障害、尿道通過障害、排尿困難、排尿痛、尿路閉塞など）、低ナトリウム血症、抗利尿ホルモン分泌不適症候群（SIADH）、高血圧、蓄尿障害（例、頻尿、尿失禁（例、切迫性尿失禁、腹圧性尿失禁、機能性尿失禁など）など）、多尿症、尿崩症（例、下垂体性尿崩症、腎性尿崩症など）、高ナトリウム血症、代謝性アルカリローシス、低カリウム血症、Cushing症候群、上部消化管疾患（例、消化性潰瘍（例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など）、胃炎、逆流性食道炎、NUD（Non Ulcer Dyspepsia）、胃癌、胃MALTリンパ腫、非ステロイド系抗炎症剤に起因する潰瘍、胃酸過多、潰瘍など）、消化不良症（例、下垂体性消化不良症、腎性消化不良症など）、骨代謝障害（例、骨粗しょう症、骨軟化症など）、貧血症（例、鉄欠乏性貧血など）など）に罹患している、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

例えば、胃酸過多症の診断においては、体液中のNPWを定量し、NPWの量が正常時より多い場合、例えば、血中濃度として約10 fmol/ml以上、好ましくは約15 fmol/ml以上の場合、胃酸過多症と診断する。

## 〔2〕本発明の抗体を含有してなる医薬

本発明の抗体は、NPWの活性（例、GPR7結合活性、GPR8結合活性、GPR7細胞刺激活性、GPR8細胞刺激活性、摂食行動抑制作用、プロラクチン産生作用、抗利尿作用、胃酸分泌促進作用など）を中和するため、NPWが関与する疾患、例えば拒食症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル症候群、アルゴンツ・デル・カスティロ症候群、フォーベス・アルブライト症候群、リンパ腫、シーハン症候群、精子形成異常、腎性浮腫、尿排出障

害（例、膀胱収縮障害、尿道通過障害、排尿困難、排尿痛、尿路閉塞など）、低ナトリウム血症、抗利尿ホルモン分泌不適症候群（SIADH）、高血圧、上部消化管疾患（例、消化性潰瘍（例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など）、胃炎、逆流性食道炎、NUD（Non Ulcer

- 5 Dyspepsia）、胃癌、胃MALTリンパ腫、非ステロイド系抗炎症剤に起因する潰瘍、胃酸過多、潰瘍など）などの予防・治療剤、摂食（食欲）促進剤などの安全な医薬として使用することができる。中でも不妊症、腎性浮腫、消化性潰瘍、胃酸過多症などの予防・治療剤が好ましい。

- 10 本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記抗体またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

- 15 例えば、非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、  
20 適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、HCO-50（polyoxyethylene（50mol）adduct of hydrogenated castor oil）〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアン  
25 プルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあ

げられる。かかる組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

- 5 上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常5～500mg、とりわけ注射剤では5～100mg、その他の剤形では10～250mgの上記抗体が含有されていることが好ましい。
- 10

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

- 本発明の抗体を含有する上記疾患の予防・治療剤は低毒性であり、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、
- 15 ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の胃酸過多症の治療のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.01～20mg/kg体重程度、好ましくは0.1～10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1～5mg/kg体重程度を、
- 20 1日1～5回程度、好ましくは1日1～3回程度、非経口投与するのが好都合である。経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

- 本発明の明細書において、アミノ酸等を略号で表示する場合、IUPAC-IUB
- 25 Commision on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。アミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

G l y : グリシン

A l a : アラニン

|    |           |                                 |
|----|-----------|---------------------------------|
|    | V a l     | : バリン                           |
|    | L e u     | : ロイシン                          |
|    | I l e     | : イソロイシン                        |
|    | S e r     | : セリン                           |
| 5  | T h r     | : スレオニン                         |
|    | C y s     | : システイン                         |
|    | M e t     | : メチオニン                         |
|    | G l u     | : グルタミン酸                        |
|    | A s p     | : アスパラギン酸                       |
| 10 | L y s     | : リジン                           |
|    | A r g     | : アルギニン                         |
|    | H i s     | : ヒスチジン                         |
|    | P h e     | : フェニルアラニン                      |
|    | T y r     | : チロシン                          |
| 15 | T r p     | : トリプトファン                       |
|    | P r o     | : プロリン                          |
|    | A s n     | : アスパラギン                        |
|    | G l n     | : グルタミン                         |
|    | T F A     | : トリフルオロ酢酸                      |
| 20 | D M F     | : N,N-ジメチルホルムアミド                |
|    | S P D P   | : 3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸N-スクシンイミジル |
|    | G M B S   | : N-(4-マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミド     |
|    | B S A     | : ウシ血清アルブミン                     |
|    | B T G     | : ウシチログロブリン                     |
| 25 | E I A     | : エンザイムイムノアッセイ                  |
|    | H P L C   | : 逆相高速液体クロマトグラフィー               |
|    | H R P     | : 西洋ワサビパーオキシダーゼ                 |
|    | F B S     | : ウシ胎児血清                        |
|    | d - F B S | : 透析済みウシ胎児血清                    |



|    |       |   |
|----|-------|---|
|    | TMB   | : 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンチジン                              |
|    | NMP   | : N-メチルピロリドン  |
|    | Boc   | : ターシャリプトキシカルボニル  |
|    | Fmoc  | : 9-フルオレニルメトキシカルボニル                                     |
| 5  | DCC   | : N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド                                 |
|    | Pbf   | : 2, 2, 4, 6, 7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル                |
|    | tBu   | : ターシャリブチル  |
|    | Trt   | : トリチル  |
|    | Tos   | : パラトルエンスルホニル   |
| 10 | DEA   | : N, N'-ジイソプロピルエチルアミン                                   |
|    | HOBt  | : 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール                                      |
|    | HOAt  | : 1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール                                 |
|    | PyAop | : 7-アザベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリスピロリジノホス<br>ホニウム ヘキサフルオロホスフェイト |
| 15 | Clt   | : 2-クロロトリチル   |
|    | BHA   | : ベンツヒドリルアミン  |

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

- 20 以下の実施例1において使用した免疫原作製用のペプチド（本明細書においてpeptide-1と記載することがある）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕

以下の実施例1において使用した免疫原作製用のペプチド（本明細書においてpeptide-2と記載することがある）のアミノ酸配列を示す。

- 25 〔配列番号：3〕

以下の実施例1において使用した免疫原作製用のペプチド（本明細書においてpeptide-3と記載することがある）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：4〕

ヒトニューロペプチドW（1-23）（本明細書においてヒトNPW23と

記載することがある) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：5〕

ヒトニューロペプチドW (1-30) (本明細書においてヒトNPW30と記載することがある) のアミノ酸配列を示す。

5 〔配列番号：6〕

ラットニューロペプチドW (1-23) (本明細書においてラットNPW23と記載することがある) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：7〕

10 ラットニューロペプチドW (1-30) (本明細書においてラットNPW30と記載することがある) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：8〕

マウスニューロペプチドW (1-23) (本明細書においてマウスNPW23と記載することがある) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：9〕

15 マウスニューロペプチドW (1-30) (本明細書においてマウスNPW30と記載することがある) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：10〕

ブタニューロペプチドW (1-23) (本明細書においてブタNPW23と記載することがある) のアミノ酸配列を示す。

20 〔配列番号：11〕

ブタニューロペプチドW (1-30) (本明細書においてブタNPW30と記載することがある) のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：12〕

25 以下の実施例1において作製したビオチン標識化peptide-1のアミノ酸配列を示す。XaaはBiotin (Long Arm) Maleimide (VECTOR LABORATORIES) によってビオチン標識されたCys残基を示す。

〔配列番号：13〕

以下の実施例1において作製したビオチン標識化peptide-2のアミノ酸配列を示す。XaaはBiotin (Long Arm) Maleimide (VECTOR LABORATORIES) によってビ

オチン標識されたCys残基を示す。

〔配列番号：14〕

以下の実施例1において作製したピオチン標識化peptide-3のアミノ酸配列を示す。XaaはBiotin (Long Arm) Maleimide (VECTOR LABORATORIES)によってピ

5 オチン標識されたCys残基を示す。

〔配列番号：15〕

ヒトGPR7のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：16〕

配列番号：15で表されるアミノ酸をコードするDNAの塩基配列を示す。

10 〔配列番号：17〕

ヒトGPR8のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：18〕

配列番号：17で表されるアミノ酸をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：19〕

15 ラットGPR7（公知文献（WO02/44368）に記載のTGR26と同一のレセプタータンパク質）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：20〕

配列番号：19で表されるアミノ酸をコードするDNAの塩基配列を示す。

20 後述の実施例1で得られたハイブリドーマ細胞AhW23N2G6D1は、2003年4月23日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに、寄託番号FERM BP-8363として寄託されている。

25 後述の実施例1で得られたハイブリドーマ細胞AhW23N3H3E4は、2003年4月23日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに、寄託番号FERM BP-8364として寄託されている。

後述の実施例1で得られたハイブリドーマ細胞AhW23C6G1H8は、2003年4月23日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政

法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに、寄託番号FERM BP-8365として寄託されている。

5 後述の実施例 1 で得られたハイブリドーマ細胞AhW23C5G2F6は、2003年4月23日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに、寄託番号FERM BP-8366として寄託されている。

10 後述の実施例 1 で得られたハイブリドーマ細胞ArW30C3A1Aは、2003年4月23日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに、寄託番号FERM BP-8367として寄託されている。

15 後述の実施例 1 で得られたハイブリドーマ細胞ArW30C7F2E8は、2003年4月23日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに、寄託番号FERM BP-8368として寄託されている。

20 各ハイブリドーマ細胞から得られる抗体については細胞名の後に「a」を付けた形で表す。

後述の実施例で得られた抗体、2G6-D1、3H3-E4、5G2-F6、6G1-H8、3A1Aおよび7F2-E8は、それぞれAhW23N2G6D1a、AhW23N3H3a、AhW23C5G2F6a、AhW23C6G1H8a、ArW30C3A1AaおよびArW30C7F2E8aと表されることもある。

20

以下に、実施例および参考例を示し、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

25 本明細書においてヒトNPW23、ラットNPW23、マウスNPW23およびブタNPW23を総称してNPW23と記載することがある。また、ヒトNPW30、ラットNPW30、マウスNPW30およびブタNPW30を総称してNPW30と記載することがある。さらに、NPW23およびNPW30を総称してNPWと記載することがある。

#### 実施例 1

#### 抗NPWモノクローナル抗体の作製

(1) NPWのアミノ末端領域と結合する抗体作製のための免疫原の調製

NPWのアミノ末端領域と結合する抗体を作製するために、ヒトNPW23のアミノ末端13残基ペプチドのカルボキシル末端にシステインを付加したペプチド

(peptide-1、配列番号：1) をシステイン残基を介してブタチログロブリンとの複合体とし、免疫原を作製した。

2.5 mlのphosphate-buffered saline (PBS, Nissui Pharma)に溶解した35.0 mgのブタチログロブリン (SIGMA) に、9.1 mgのSulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1 carboxylate (Sulfo-SMCC, PIERCE)を添加し、室温で1時間攪拌した。Sulfo-SMCCと反応したブタチログロブリンをPD-10

(Amersham Biosciences)を利用した分子ふるいクロマトグラフィーにより、大過剰にある未反応のSulfo-SMCCから分離した。Sulfo-SMCCと反応したブタチログロブリンにあらかじめ0.2 mlの0.1%酢酸溶液に溶かした4 mgのpeptide-1

(配列番号：1) と1.8 mlのPBSを添加して4℃で16時間攪拌し、peptide-1とブタチログロブリンの複合体を得た。このpeptide-1とブタチログロブリンの複合体をNPWのアミノ末端領域と結合する抗体作製のための免疫原とした。

(2) NPW23のカルボキシル末端領域と結合する抗体作製のための免疫原の調製

NPW23のカルボキシル末端領域と結合する抗体を作製するために、ヒトNPW23のカルボキシル末端13残基ペプチドのアミノ末端にシステインを付加したペプチド (peptide-2、配列番号：2) をシステイン残基を介してブタチログロブリンとの複合体とし、免疫原を作製した。

2.5 mlのPBSに溶解した 35.2 mgのブタチログロブリンに、9.1 mgの Sulfo-SMCCを添加し、室温で1時間攪拌した。Sulfo-SMCCと反応したブタチログロブリンをPD-10を利用した分子ふるいクロマトグラフィーにより、大過剰にある未反応のSulfo-SMCCから分離した。Sulfo-SMCCと反応したブタチログロブリンに

あらかじめ0.2 mlの0.1%酢酸溶液に溶かした4 mgのpeptide-2 (配列番号：2) と1.8 mlのPBSを添加して4℃で16時間攪拌し、peptide-2とブタチログロブリンの複合体を得た。このpeptide-2とブタチログロブリンの複合体をNPW23のカルボキシル末端領域と結合する抗体作製のための免疫原とした。

(3) NPW30のカルボキシル末端領域と結合する抗体作製のための免疫原の調製

NPW30のカルボキシル末端領域と結合する抗体を作製するために、ラット NPW30のカルボキシル末端15残基ペプチドのアミノ末端にシステインを付加したペプチド (peptide-3、配列番号：3) をシステイン残基を介してブタチログロブリンとの複合体とし、免疫原を作製した。

- 5        2.5 mlのPBSに溶解した 20.0 mgのkeyhole limpet hemocyanin (KLH, PIERCE)に、5.0 mgのSulfo-SMCCを添加し、室温で1時間攪拌した。Sulfo-SMCCと反応したKLHをPD-10を利用した分子ふるいクロマトグラフィーにより、大過剰にある未反応のSulfo-SMCCから分離した。Sulfo-SMCCと反応したKLHにあら
- 10        じめ0.2 mlの0.1 %酢酸溶液に溶かした4 mgのpeptide-3 (配列番号：3) と 1.8 mlのPBSを添加して4℃で16時間攪拌し、peptide-3とブタチログロブリンの複合体を得た。このpeptide-3とブタチログロブリンの複合体をNPW30のカルボキシル末端領域と結合する抗体作製のための免疫原とした。

#### (4) マウスの免疫

- 15        上記(1)、(2)および(3)に記載の方法によって調製した各免疫原にフロイント完全アジュバントを混合し、各ペプチド (peptide-1、peptide-2またはpeptide-3) 0.1 mgに相当する混合物をBalb/cマウス (雌、6～8週齢) の腹腔内にそれぞれ投与した。初回免疫からおよそ4週間後、上記(1)、

- 20        (2) および(3)に記載の方法によって調製した免疫原とフロイントの不完全アジュバントを混合し、各ペプチド0.05 mgに相当する混合物を初回免疫したBalb/cマウス (雌、6～8週齢) の腹腔内にそれぞれ投与した。2回目の免疫以降、抗体価が上昇するまで2週間間隔で各ペプチド0.05 mgに相当する免疫原とフロイントの不完全アジュバントの混合物をそれぞれ免疫した。

#### (5) Peptide-1、peptide-2およびpeptide-3のビオチン標識化

- 25        Peptide-1 (配列番号：1)、peptide-2 (配列番号：2) およびpeptide-3 (配列番号：3) のシステイン残基をビオチンにより標識してビオチン標識化したpeptide-1、peptide-2およびpeptide-3を合成した。50 nmolの各ペプチドと500 nmolのBiotin (Long Arm) Maleimide (VECTOR LABORATORIES)を0.5 mlの0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.0)に溶解し、この溶液を37℃で3時間保温した。Peptide-1、peptide-2およびpeptide-3のシステイン残基のみがビオチンによ

て標識された生成物をそれぞれHPLCによって分取し、ビオチン標識化peptide-1 (配列番号: 1 2)、ビオチン標識化peptide-2 (配列番号: 1 3) およびビオチン標識化peptide-3 (配列番号: 1 4) を得た。

(6) NPWのアミノ末端領域と結合する抗体の抗体価の測定

- 5 NPWのアミノ末端領域と結合する抗体の抗体価はビオチン標識化peptide-1 (配列番号: 1 2) を使用した酵素免疫法により測定した。抗マウスIgG固相化プレートを用いて以下のように作製した。50 mM炭酸緩衝液 (pH 9.6) で10  $\mu$ g/mlに希釈したヤギ抗マウスIgG (Fc) (ICN Biomedicals) を96ウェルイムノプレートに1ウェル当たり100  $\mu$ l添加し、4℃で3日間静置した。ウェル内の溶液を捨て、ブ
- 10 ロックエース (雪印乳業) を1ウェル当たり350  $\mu$ l添加し、4℃で3日間静置した。ウェル内の溶液を捨て、3%ショ糖および0.1%ウシ血清アルブミン (BSA) を含むPBSを1ウェル当たり350  $\mu$ l添加し、4℃で1日間静置した。ウェル内の溶液を捨て、デシケーター内で3日間乾燥させた後、このプレートを使用するまで4℃で保存した。
- 15 上記(1)に記載の方法により調製したpeptide-1とブタチログロブリンの複合体を免疫したマウスから得た血清を0.1%BSAを含むPBSで種々の倍率で希釈した。希釈血清溶液50  $\mu$ l、0.1%BSAを含むPBSまたはNPW23溶液50  $\mu$ lおよび上記
- 20 (5)に記載の方法により作製したビオチン標識化peptide-1溶液を0.1% BSAを含むPBSで1000~64000倍に希釈した溶液50  $\mu$ lを上記のようにして作製した抗マウスIgG固相化プレートのウェルに添加して室温で2~3時間静置した。ウェル内の溶液を捨て、ウェルを0.9%塩化ナトリウムおよび0.05% Tween20を含む蒸留水で4回洗浄した。ストレプトアビジン—西洋ワサビペルオキシダーゼ
- 25 (HRP) 複合体溶液 (Calbiochem) を0.1% BSAを含むPBSで12000倍に希釈し、この希釈溶液100  $\mu$ lを各ウェルに添加し、室温で1時間静置した。ウェル内の溶液を捨て、ウェルを0.9%塩化ナトリウムおよび0.05% Tween20を含む蒸留水で4回洗浄した。HRPの基質は、10 mgのオルソフェニレンジアミン錠剤 (SIGMA) を33 mMクエン酸および0.015%過酸化水素を含む66 mMリン酸水素二ナトリウム十二水和物水溶液11 mlに溶解して調製した。この基質溶液100  $\mu$ lをそれぞれのウェルに添加して室温で10~30分間静置した。100  $\mu$ lの2 N硫酸をそれぞれのウ

エルに添加して反応を止めた後、基質溶液の492 nmにおける吸光度を測定した。ウェルの吸光度が高い場合は血清中にNPWのアミノ末端領域と結合する抗体が存在することを意味する。また、吸光度が過剰量のNPWの添加によりバックグラウンド程度に低下することはこの抗体とNPWのアミノ末端領域との結合が配列特異的であることを意味する。

(7) NPW23のカルボキシル末端領域と結合する抗体の抗体価の測定

NPW23のカルボキシル末端領域と結合する抗体の抗体価はビオチン標識化 peptide-2 (配列番号: 1 3) を使用した酵素免疫法により測定した。抗マウス IgG固相化プレートは上記 (6) に記載の方法で作製した。上記 (2) に記載の方法により調製した peptide-2 とブタチログロブリンの複合体を免疫したマウスから得た血清を0.1% BSAを含むPBSで種々の倍率で希釈した。希釈血清溶液 50  $\mu$ l、0.1% BSAを含むPBSまたはNPW23溶液50  $\mu$ lおよび上記 (5) に記載の方法により作製したビオチン標識化 peptide-2 溶液を0.1% BSAを含むPBSで1000~64000倍に希釈した溶液50  $\mu$ lを抗マウスIgG固相化プレートのウェルに添加して室温で2~3時間静置した。ウェル内の溶液を捨て、ウェルを0.9%塩化ナトリウムおよび0.05% Tween20を含む蒸留水で4回洗浄した。ストレプトアビジン-HRP複合体溶液を0.1% BSAを含むPBSで12000倍に希釈し、この希釈溶液100  $\mu$ lを各ウェルに添加し、室温で1時間静置した。ウェル内の溶液を捨て、ウェルを0.9%塩化ナトリウムおよび0.05% Tween20を含む蒸留水で4回洗浄した。HRPの基質は実施例 8 と同様にして調製し、基質溶液100  $\mu$ lをそれぞれのウェルに添加して室温で10~30分間静置した。100  $\mu$ lの2 N硫酸をそれぞれのウェルに添加して反応を止めた後、基質溶液の492 nmにおける吸光度を測定した。ウェルの吸光度が高い場合は血清中にNPW23のカルボキシル末端領域と結合する抗体が存在することを意味する。また、吸光度が過剰量のNPW23の添加によりバックグラウンド程度に低下することはこの抗体とNPW23カルボキシル末端領域との結合が配列特異的であることを意味する。

(8) NPW30のカルボキシル末端領域と結合する抗体の抗体価の測定

NPW30のカルボキシル末端領域と結合する抗体の抗体価はビオチン標識化 peptide-3 (配列番号: 1 4) を使用した酵素免疫法により測定した。抗マウス



IgG固相化プレートは、上記（6）に記載の方法で作製した。上記（3）に記載の方法により調製したpeptide-3とKLHの複合体を免疫したマウスから得た血清を0.1% BSAを含むPBSで種々の倍率で希釈した。希釈血清溶液50  $\mu$ l、0.1% BSAを含むPBSまたはNPW30溶液50  $\mu$ lおよび上記（5）に記載の方法により作製した5 ビオチン標識化peptide-3溶液を0.1% BSAを含むPBSで1000~64000倍に希釈した溶液50  $\mu$ lを抗マウスIgG固相化プレートのウェルに添加して室温で2~3時間静置した。ウェル内の溶液を捨て、ウェルを0.9%塩化ナトリウムおよび0.05% Tween20を含む蒸留水で4回洗浄した。ストレプトアビジン—HRP複合体溶液を0.1% BSAを含むPBSで12000倍に希釈し、この希釈溶液100  $\mu$ lを各ウェル10 に添加し、室温で1時間静置した。ウェル内の溶液を捨て、ウェルを0.9%塩化ナトリウムおよび0.05% Tween20を含む蒸留水で4回洗浄した。HRPの基質は実施例8と同様にして調製し、基質溶液100  $\mu$ lをそれぞれのウェルに添加して室温で10~30分間静置した。100  $\mu$ lの2 N硫酸をそれぞれのウェルに添加して反応を止めた後、基質溶液の492 nmにおける吸光度を測定した。ウェルの吸光度が15 高い場合は血清中にNPW30のカルボキシル末端領域と結合する抗体が存在することを意味する。また、吸光度が過剰量のNPW30の添加によりバックグラウンド程度に低下することはこの抗体とNPW30カルボキシル末端領域との結合が配列特異的であることを意味する。

#### 20 （9）細胞融合、抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング、モノクローナル抗体取得と腹水取得

上記（4）に記載の方法によって免疫したマウスの血清の各抗原に対する抗体価を上記（6）、（7）または（8）に記載の方法によって測定し、比較的高い抗体価を示したマウスに対して0.05 mgの免疫原を50  $\mu$ lのPBSに溶解した溶液を静脈内に投与することにより最終免疫を行なった。最終免疫から3~4日後25 のマウスから脾臓を摘出し、ステンレスメッシュで圧迫した後、ろ過し、RPMI 1640培地に浮遊させて脾臓細胞浮遊液を得た。細胞融合に用いる細胞としてBalb/c由来ミエローマ細胞P3X63Ag8.653を用いた。細胞融合は原報（Kohler, G. & Milstein, C., Nature, 256巻, 495頁, 1975年）に準じて行なった。すなわち、脾臓細胞およびP3X63Ag8.653をそれぞれ血清を含有しないRPMI 1640で3度

洗浄し、脾臓細胞とP3X63Ag8.653細胞の細胞数の比率を10:1になるよう混合して800回/分の回転数で15分間遠心を行なって細胞を沈殿させた。上清を充分に除去した後、沈殿を軽くほぐし、0.2 mlのポリエチレングリコール (HYBRI-MAX, SIGMA) を30秒間かけて加え、次に5 mlのRPMI 1640を2分間かけて加え、最後に5 mlのRPMI 1640を加えた。この混合液を37℃で3分間保温して細胞融合を進行させた。融合後、600回/分の遠心速度で15分間遠心した。この細胞沈殿物にHAT (ヒポキサンチン $1 \times 10^{-4}$ M、アミノプテリン $4 \times 10^{-7}$ M、チミジン $1.6 \times 10^{-3}$ M) および10%ウシ胎児血清を含むRPMI 1640培地を加えてP3X63Ag8.653の細胞数が0.2 ml 当たり $2 \sim 3 \times 10^5$  個になるように調製し、96ウェルプレートに1ウェルあたり0.2 mlを播種した。培養開始後9~14日で培養液が黄変したとき上清を採取し、細胞融合されたハイブリドーマの培養上清中の抗体価を上記(6)、(7)または(8)に記載の方法によってそれぞれ測定した。

ハイブリドーマ培養上清中にNPWのアミノ末端、NPW23のカルボキシル末端またはNPW30のカルボキシル末端に対して特異的に結合する抗体の存在を確認した後、これらのハイブリドーマ細胞を限界希釈法によりクローニングした。1ウェル当たり $5 \times 10^5$  個のBalb/cマウス胸腺細胞をあらかじめ播種した96ウェルプレートに平均1個のハイブリドーマを含む100  $\mu$ lの培養液 (HATおよび10%ウシ胎児血清を含むRPMI 1640) をそれぞれ添加した。10日間培養した後、一つのコロニーからなるハイブリドーマが生育したウェルの培養上清中の抗体価を測定し、NPWのアミノ末端、NPW23のカルボキシル末端あるいはNPW30のカルボキシル末端に対してそれぞれ特異的な抗体を産生するハイブリドーマ細胞を選択した。

腹腔内に0.5 mlのプリスタンを投与したヌードマウス (Balb/c AnNCrj-nu/nu、雌、6~8週齢) に、1匹当たり $1 \times 10^6$  から $5 \times 10^6$  個の上記のようにして選択したハイブリドーマ細胞を腹腔内投与し、6~20日後に抗体含有腹水を採取した。得られた腹水よりモノクローナル抗体をプロテインAカラムにより精製した。即ち、6~20mlの腹水を等量の結合緩衝液 (3.5M NaCl、0.05%  $\text{NaN}_3$ を含む1.5M グリシン緩衝液 (pH9.0)) で希釈した後、あらかじめ結合緩衝液で平衡化したプロテインA-セルロース (生化学工業) カラムに供し、特異抗体を溶離緩衝液 (0.05%  $\text{NaN}_3$ を含む0.1Mクエン酸緩衝液、pH3.0) で溶出した。この抗体を

含む溶出液を中和した後、Centriplus YM-50 (Amicon)により濃縮した。この抗体濃縮液にPBSを加えて、Centriplus YM-50による濃縮を繰り返すことにより抗体が溶けている緩衝液をPBSに置換した。

(10) NPWのアミノ末端領域と結合するモノクローナル抗体

5 上記(9)に記載の方法により取得したNPWのアミノ末端領域に特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマ細胞から得られた4種類のモノクローナル抗体、2G6-D1、3H3-E4、5E6-C3および7F9-E12について酵素免疫法によって peptide-1 (配列番号: 1)、ヒトNPW23 (配列番号: 4) およびヒトNPW30 (配列番号: 5) を認識することを確認した。マウスIgG固相化プレートを以下のよう  
10 にして作製した。50 mM炭酸緩衝液 (pH 9.6)で10  $\mu$ g/mlに希釈したヤギ抗マウスIgG (Fc) (ICN Biomedicals) を96ウェルイムノプレートに1ウェル当たり150  $\mu$ l添加し、4℃で1日間静置した。ウェル内の溶液を捨て、ブロックエースを1ウェル当たり200  $\mu$ l添加し、このプレートを使用するまで4℃で保存した。

15 2G6-D1、3H3-E4、5E6-C3または7F9-E12抗体を産生するハイブリドーマ培養上清をEIA緩衝液 (0.1%BSA、0.4%塩化ナトリウム、2 mM EDTA、0.05% CHAPS (3-((3-cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propanesulfonate)、20 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) ) によりそれぞれ固定した倍率 (50~1000倍) で希釈した。これらの抗体溶液50  $\mu$ l、種々の濃度にEIA緩衝液で希釈したpeptide-1 (配列番号: 1)、ヒトNPW23 (配列番号: 4) またはヒトNPW30 (配列番号: 5) 溶液  
20 50  $\mu$ lおよびEIA緩衝液で75000倍希釈したビオチン標識化peptide-1溶液50  $\mu$ lを上記のマウスIgG固相化プレートに添加した。これらのプレートを4℃で16時間静置した後、それぞれのウェルをPBSで洗浄した。各ウェルにEIA緩衝液で20000倍に希釈したストレプトアビジン-HRP溶液150  $\mu$ l を加えて室温で2時間静置した。PBSで洗浄した後、TMBマイクロウェルパーオキシダーゼ基質

25 (KIRKEGAARD&PERRY LAB, INC) 150  $\mu$ l を添加して室温で静置した。反応を1 Mリン酸75  $\mu$ lを加えて停止した後、450 nmにおける吸光度をプレートリーダー (BICHROMATIC、大日本製薬社製) で測定した。この反応系で相対的結合 (%) とは、抗体溶液、EIA緩衝液およびビオチン標識化peptide-1溶液を添加したウェルの吸光度からEIA緩衝液とビオチン標識化peptide-1溶液を添加したウェル

の吸光度を減じた値を100%結合としたときのそれぞれのウェルにおける吸光度からEIA緩衝液とビオチン標識化peptide-1溶液を添加したウェルの吸光度を減じた値の相対値である。

図1、図2、図3および図4に示すように、2G6-D1、3H3-E4、5E6-C3および  
5 7F9-E12抗体とビオチン標識化peptide-1との結合は濃度依存的にpeptide-1、ヒトNPW23およびヒトNPW30によって阻害された。

このことは、2G6-D1、3H3-E4、5E6-C3および7F9-E12抗体は、NPWのアミノ末端領域を認識してNPWと結合することを意味する。

NPWのアミノ末端領域を特異的に認識する抗体である2G6-D1 (AhW23N2G6D1a)  
10 および3H3-E4 (AhW23N3H3a) を産生するハイブリドーマ細胞を、AhW23N2G6D1およびAhW23N3H3E4とそれぞれ命名した。

(11) NPW23のカルボキシル末端領域と結合するモノクローナル抗体

上記(9)に記載の方法により取得したNPW23のカルボキシル末端領域に特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマ細胞から得られた6種類のモノク  
15 ローナル抗体、2F1B2A、5A2A、5D6-F10、5G2-F6、6G1-H8および7B4-D2について酵素免疫法によってpeptide-2 (配列番号: 2) およびヒトNPW23 (配列番号: 4) を認識することを確認した。マウスIgG固相化プレートは、上記(10)に従って作製した。2F1B2A、5A2A、5D6-F10、5G2-F6、6G1-H8または7B4-D2抗体を産生するハイブリドーマ培養上清を上記(10)に記載のEIA緩衝液によりそれぞれ固定した倍率 (30~1000倍) で希釈した。これらの抗体溶液50 $\mu$ l、種々の濃度にEIA緩衝液で希釈したpeptide-2 (配列番号: 2)、ヒトNPW23 (配列番号: 4) またはヒトNPW30 (配列番号: 5) 溶液50 $\mu$ lおよびEIA緩衝液でそれぞれ固定した倍率 (75000~225000倍) に希釈したビオチン標識化peptide-2溶液50 $\mu$ lをマウスIgG固相化プレートに添加した。これらのプレートを4℃で16時間  
20 静置した後、それぞれのウェルをPBSで洗浄した。各ウェルにEIA緩衝液で20000倍に希釈したストレプトアビジン-HRP溶液150 $\mu$ lを加えて室温で2時間静置した。PBSで洗浄した後、TMBマイクロウェルパーオキシダーゼ基質150 $\mu$ lを添加して室温で静置した。反応を1 Mリン酸75 $\mu$ lを加えて停止した後、450 nmにおける吸光度をプレートリーダーで測定した。この反応系で相対的結合 (%) と

は、抗体溶液、EIA緩衝液およびビオチン標識化peptide-2溶液を添加したウェルの吸光度からEIA緩衝液とビオチン標識化peptide-2溶液を添加したウェルの吸光度を減じた値を100%結合としたときのそれぞれのウェルにおける吸光度からEIA緩衝液とビオチン標識化peptide-2溶液を添加したウェルの吸光度を減じた値の相対値である。

図5、図6、図7、図8、図9および図1.0に示すように、2F1B2A、5A2A、5D6-F10、5G2-F6、6G1-H8および7B4-D2抗体とビオチン標識化peptide-2との結合はpeptide-2およびヒトNPW23によって阻害された。

このことは、2F1B2A、5A2A、5D6-F10、5G2-F6、6G1-H8および7B4-D2抗体はNPW23のカルボキシル末端領域を認識してNPW23と結合することを意味する。

NPW23のカルボキシル末端領域を特異的に認識する抗体である5G2-F6 (AhW23C5G2F6a) および6G1-H8 (AhW23C6G1H8a) を産生するハイブリドーマ細胞をそれぞれAhW23C5G2F6およびAhW23C6G1H8と命名した。

(12) NPW30のカルボキシル末端領域と結合するモノクローナル抗体

上記(9)に記載の方法により取得したNPW30のカルボキシル末端領域に特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマ細胞から得られた3種類のモノクローナル抗体、2A1A、3A1Aおよび7F2-E8について酵素免疫法によってpeptide-3 (配列番号：3) およびヒトNPW30 (配列番号：5) を認識することを確認した。マウスIgG固相化プレートは、上記(10)に従って作製した。2A1A、3A1Aまたは7F2-E8抗体を産生するハイブリドーマ培養上清を上記(10)に記載のEIA緩衝液により100倍希釈した。これらの抗体溶液50 $\mu$ l、種々の濃度にEIA緩衝液で希釈したpeptide-3 (配列番号：3)、ヒトNPW23 (配列番号：4) またはヒトNPW30 (配列番号：5) 溶液50 $\mu$ lおよびEIA緩衝液で100000倍希釈したビオチン標識化peptide-3溶液50 $\mu$ lをマウスIgG固相化プレートに添加した。これらのプレートを4 $^{\circ}$ Cで16時間静置した後、それぞれのウェルをPBSで洗浄した。各ウェルにEIA緩衝液で20000倍に希釈したストレプトアビジン-HRP溶液150 $\mu$ lを加えて室温で2時間静置した。PBSで洗浄した後、TMBマイクロウェルパーオキシダーゼ基質150 $\mu$ lを添加して室温で静置した。反応を1Mリン酸75 $\mu$ lを加えて停止した後、450 nmにおける吸光度をプレートリーダーで測定した。この反応

系で相対的結合 (%) とは、抗体溶液、EIA緩衝液およびビオチン標識化 peptide-3 溶液を添加したウェルの吸光度からEIA緩衝液とビオチン標識化 peptide-3 溶液を添加したウェルの吸光度を減じた値を100%結合としたときのそれぞれのウェルにおける吸光度からEIA緩衝液とビオチン標識化 peptide-3 溶液を添加したウェルの吸光度を減じた値の相対値である。

図 1 1、図 1 2 および図 1 3 に示すように、2A1A、3A1A および 7F2-E8 抗体とビオチン標識化 peptide-3 との結合は peptide-3 および ヒト NPW30 によって阻害された。このことは、2A1A、3A1A および 7F2-E8 抗体は NPW30 のカルボキシル末端領域を認識して NPW30 と結合することを意味する。

- 10 NPW30 のカルボキシル末端領域を特異的に認識する抗体である 3A1A (ArW30C3A1Aa) および 7F2-E8 (ArW30C7F2E8a) を産生するハイブリドーマ細胞をそれぞれ ArW30C3A1A および ArW30C7F2E8 と命名した。

## 実施例 2

- 15 抗NPWモノクローナル抗体によるNPWのアゴニスト活性の抑制

実施例 1 - (1 0)、1 - (1 1) および 1 - (1 2) に記載のモノクローナル抗体によるNPWのアゴニスト活性に対する抑制作用を調べた。NPWと抗NPWモノクローナル抗体を室温で1時間反応させた後、この反応液をW0 02/93161号公報記載の方法により作製したヒトGPR7 (配列番号: 1 5) を発現するCHO細胞株、

20 W0 01/98494号公報記載の方法により作製したヒトGPR8 (配列番号: 1 7) を発現するCHO細胞株またはW0 02/44368号公報記載の方法により作製したラットGPR7 (W0 02/44368に記載のTGR26と同一のレセプター) (配列番号: 1 9) を発現するCHO細胞株に添加してフォルスコリン (FSK) 刺激によるこれらの細胞のcAMP蓄積を阻害する活性を測定した。

- 25 本実施例において用いた各NPWと各抗NPWモノクローナル抗体を希釈するバッファー (以下、希釈バッファーと称する) として20 mM HEPES、0.05% BSA、2  $\mu$ M FSK および 0.2 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) を含む pH 7.4 の MEM  $\alpha$  培地を用いた。この希釈バッファーで調製した2 nMの各NPWと種々の濃度の各抗NPWモノクローナル抗体IgG混合液を室温で1時間保温した。ヒトGPR7発現CHO

細胞株、ヒトGPR8発現CHO細胞株またはラットGPR7発現CHO細胞株は $5 \times 10^4$ 個を24ウェルプレートに播種して2日間培養し、各NPWと各抗NPW抗体の反応液を添加する前に各ウェルを0.5 mlの20 mM HEPES、0.05% BSAおよび0.2 mM IBMXを含むMEM $\alpha$ 培地（以下、洗浄バッファーと称する）で3回洗浄した後、1ウェル当たり0.5 mlの洗浄バッファーを添加した。30分間培養し、さらに0.5 mlの洗浄バッファーで3回洗浄した後、1ウェル当たり0.25 mlの洗浄バッファーと0.25 mlのNPWと抗NPW抗体の反応液を添加した。37℃で30分間保温した後、各ウェルに0.1 mlの20%過塩素酸を添加することによって細胞内のcAMP合成反応を停止させ、次に24ウェルプレートを氷上に1時間置くことでcAMPを抽出した。抽出液中のcAMP量は、cAMP EIAシステム（Amersham Biosciences）で測定した。cAMP蓄積の相対値（%）は、測定試料添加の細胞内のcAMP量からFSK非添加の細胞内cAMP量を減じた値のFSK刺激のみの細胞内cAMP量からFSK非添加の細胞内cAMP量を減じた値に対する相対比率である。

ヒトNPW23（配列番号：4）をNPWアミノ末端認識モノクローナル抗体である2G6-D1、3H3-E4、5E6-C3および7F9-E12と反応させた後、反応液をヒトGPR7発現細胞株またはヒトGPR8発現細胞株に投与した。ヒトNPW23のみの投与によりヒトGPR7発現細胞内のcAMP量はFSK刺激のみの場合に比べ46%に減少したが、ヒトNPW23をモル比で30倍過剰量の2G6-D1、3H3-E4、5E6-C3および7F9-E12と反応させることによりヒトGPR7発現細胞内のcAMP量はFSK刺激のみの場合に比べ97%、93%、69%および81%までそれぞれ回復した。結果を図14に示す。

一方、ヒトNPW23のみの投与によりヒトGPR8発現細胞内のcAMP量はFSK刺激のみの場合に比べ31%に減少したが、ヒトNPW23をモル比で30倍過剰量の2G6-D1、3H3-E4、5E6-C3および7F9-E12と反応させることによりヒトGPR8発現細胞内のcAMP量はFSK刺激のみの場合に比べ100%、100%、87%および90%までそれぞれ回復した。結果を図15に示す。

これらの結果は、2G6-D1、3H3-E4、5E6-C3および7F9-E12がヒトNPW23のcAMP合成阻害活性を抑制することを意味する。

ラットNPW23（配列番号：6）をNPWアミノ末端認識モノクローナル抗体である3H3-E4、5E6-C3および7F9-E12と反応させた後、反応液をラットGPR7発現細胞

株に投与した。ラットNPW23のみの投与によりラットGPR7発現細胞内のcAMP量はFSK刺激のみの場合に比べ9%に減少したが、ラットNPW23をモル比で30倍過剰量の3H3-E4、5E6-C3および7F9-E12と反応させることによりGPR7発現細胞内のcAMP量はFSK刺激のみの場合に比べ53%、17%および32%までそれぞれ回復した。結果を図16に示す。

これらの結果は、3H3-E4、5E6-C3および7F9-E12がラットNPW23のcAMP合成阻害活性を抑制することを意味する。

ラットNPW23またはラットNPW30（配列番号：7）をNPWアミノ末端認識モノクローナル抗体である2G6-D1と反応させた後、反応液をラットGPR7発現細胞株に投与した。ラットNPW23あるいはラットNPW30のみの投与によりラットGPR7発現細胞内のcAMP量はFSK刺激のみの場合に比べ8%および31%にそれぞれ減少したが、ラットNPW23あるいはラットNPW30をモル比で30倍過剰量の2G6-D1と反応させることによりGPR7発現細胞内のcAMP量はFSK刺激のみの場合に比べ38%および60%までそれぞれ回復した。結果を図17に示す。

これらの結果は、2G6-D1がラットNPW23およびラットNPW30のcAMP合成阻害活性を抑制することを意味する。

ラットNPW23をNPW23カルボキシル末端認識モノクローナル抗体である2F1B2A、5A2A、5D6-F10、5G2-F6、6G1-H8および7B4-D2と反応させた後、反応液をラットGPR7発現細胞株に投与した。ラットNPW23のみの投与によりラットGPR7発現細胞内のcAMP量はFSK刺激のみの場合に比べ7%に減少したが、ラットNPW23をモル比で30倍過剰量の2F1B2A、5A2A、5D6-F10、5G2-F6、6G1-H8および7B4-D2と反応させたところ、5A2A、5G2-F6および7B4-D2と反応させたときにGPR7発現細胞内のcAMP量はFSK刺激のみの場合に比べ16%、71%および73%までそれぞれ回復した。結果を図18に示す。

これらの結果は、5A2A、5G2-F6および7B4-D2がラットNPW23のcAMP合成阻害活性を抑制することを意味する。

ラットNPW30をNPW30カルボキシル末端認識モノクローナル抗体である3A1Aおよび7F2-E8と反応させた後、反応液をラットGPR7発現細胞株に投与した。ラットNPW30のみの投与によりラットGPR7発現細胞内のcAMP量はFSK刺激のみの



場合に比べ50%に減少したが、ラットNPW30をモル比で150倍過剰量の3A1Aおよび7F2-E8と反応させることによりGPR7発現細胞内のcAMP量はFSK刺激のみの場合に比べ75%および72%までそれぞれ回復した。結果を図19に示す。

これらの結果は、3A1Aおよび7F2-E8がラットNPW30のcAMP合成阻害活性を抑制  
5 することを意味する。

### 実施例3

NPW23およびNPW30を定量する2抗体EIA系の設定

(1) NPWのアミノ末端を認識する抗体の酵素標識体の作製

10 NPWのアミノ末端を認識するモノクローナル抗体である2G6-D1の酵素標識を以下のようにして行った。2 mlのPBSに溶解した4.4 mgの2G6-D1 IgG溶液1リットルの0.1 Mリン酸バッファー (pH 6.7) に対して4℃で16時間透析した。透析したIgG溶液に50  $\mu$ lのN, N-ジメチルホルムアミド (DMF) に溶解した6.4 mMのN-(4-maleimidobutyryloxy)-succinimide (GMBS、同仁化学) を添加した後、この  
15 混合液を攪拌しながら室温で40分間静置した。この反応液をSephadex G-25 (Amersham Biosciences) カラムに添加し、4℃で分子ふるいクロマトグラフィー (バッファー: 0.1 Mリン酸バッファー (pH 6.7)、流速: 0.5 ml/min) を行ってIgG画分を得た。これと同時に1.1 mlの0.1 M塩化ナトリウムを含む20 mMリン酸バッファー (pH 6.8) に溶解した7.3 mgのHRP溶液に60  $\mu$ lのDMFに溶解した  
20 45.5 mMのN-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP、和光純薬) を添加した後、この混合液を攪拌しながら室温で40分間保温した。このHRPとSPDPの反応液に400  $\mu$ lの100 mM酢酸バッファー (pH 4.5) に溶解した5.48 mMのジチオスレイトール (DTT、和光純薬) を添加した後、この混合液を攪拌しながら室温で20分間静置した。この反応液をSephadex G-25 カラムに添加し、4℃で  
25 分子ふるいクロマトグラフィー (バッファー: 0.2 mM EDTAを含む0.1 Mリン酸バッファー (pH 6.0)、流速: 0.5 ml/min) を行ってHRP画分を得た。このHRP画分と先に示したIgG画分の混合液をCentriplus YM-10 (MILLIPORE) で約2 mlに濃縮した後、この濃縮混合液を4℃で16時間保温した。この濃縮液をSephacryl S-300 (Amersham Biosciences) カラムに添加し、4℃で分子ふるい

クロマトグラフィー（バッファー：0.1 Mリン酸バッファー（pH 6.5）、流速：1.0 ml/min）を行なってHRPが結合したIgGを得た。このHRPが結合したIgGを酵素標識抗体（以下、HRP標識2G6-D1と記載する）として二抗体EIAに使用した。

### （2）NPW23を測定する二抗体EIA系の設定

- 5      NPW23のカルボキシル末端領域と結合する6種類のモノクローナル抗体、2F1B2A、5A2A、5D6-F10、5G2-F6、6G1-H8または7B4-D2を50 mM炭酸緩衝液（pH 9.6）で10  $\mu$ g/mlに調製し、100  $\mu$ lの抗体溶液を96ウェルイムノプレート（NUNC）の各ウェルに添加した。このプレートを4℃で16時間静置した後、ウェル内の溶液を捨て、ブロックエースを1ウェル当たり200  $\mu$ l添加してこのプレートを使用するまで4℃で保存した。実施例1-（10）に記載のEIA緩衝液により希釈した100  $\mu$ lの種々の濃度のNPW溶液をそれぞれのウェルに添加した後、このプレートを4℃で16時間静置した。プレートをPBSで3回洗浄した後、EIA緩衝液により固定した倍率（300～1000倍）で希釈した100  $\mu$ lのHRP標識2G6-D1をそれぞれのウェルに添加してこのプレートを4℃で16時間静置した。プレートを
- 10      PBSで4回洗浄した後、TMBマイクロウェルパーオキシダーゼ基質システム100  $\mu$ lを加えて室温で反応させた。反応を1 Mリン酸50  $\mu$ lを加えて停止させた後、450 nmにおける吸光度をプレートリーダーで測定した。それぞれの二抗体EIA系において添加したヒトNPW23（配列番号：4）、ラットNPW23（配列番号：6）、およびマウスNPW23（配列番号：8（配列番号：6と同一））の各ペプチド量に依存して450 nmにおける吸光度の増加を示した。モノクローナル抗体、2F1B2A、5A2A、5D6-F10、5G2-F6、6G1-H8および7B4-D2を用いたときの結果を図20、図21、図22、図23、図24および図25にそれぞれ示す。
- 15      これらの二抗体EIA系を用いて最小量0.3fmolのNPW23を検出することができた。なお、これらの二抗体法を用いてブタNPW23（配列番号：10）を測定することもできる。
- 20      （3）NPW30を測定する二抗体EIA系の設定

NPW30のカルボキシル末端領域と結合する3種類のモノクローナル抗体、2A1A、3A1Aまたは7F2-E8を50 mM炭酸緩衝液（pH 9.6）で10  $\mu$ g/mlに調製し、100  $\mu$ lの抗体溶液を96ウェルイムノプレート（NUNC）の各ウェルに添加した。このプレ

- ートを4℃で16時間静置した後、ウェル内の溶液を捨て、ブロックエースを1ウェル当たり200 $\mu$ l添加してこのプレートを使用するまで4℃で保存した。実施例1-(10)に記載のEIA緩衝液により希釈した100 $\mu$ lの種々の濃度のNPW溶液をそれぞれのウェルに添加した後、このプレートを4℃で16時間静置した。プレートをPBSで3回洗浄した後、EIA緩衝液により固定した倍率(300~1000倍)で希釈した100 $\mu$ lのHRP標識2G6-D1をそれぞれのウェルに添加してこのプレートを4℃で16時間静置した。プレートをPBSで4回洗浄した後、TMBマイクロウェルパーオキシダーゼ基質システム100 $\mu$ lを加えて室温で反応させた。反応を1Mリン酸50 $\mu$ lを加えて停止させた後、450 nmにおける吸光度をプレートリーダーで測定した。それぞれの二抗体EIA系において添加したヒトNPW30(配列番号: 5)、ラットNPW30(配列番号: 7)、マウスNPW30(配列番号: 9)およびブタNPW30(配列番号: 11)の各ペプチド量に依存して450 nmにおける吸光度の増加を示した。モノクローナル抗体2A1A、3A1Aおよび7F2-E8を用いたときの結果を、図26、図27および図28にそれぞれ示す。
- これらの二抗体EIA系を用いて最小量1 fmolのNPW30を検出することができた。

#### 産業上の利用可能性

- 本発明の抗体は、極めて高いNPWへの結合能を有し、NPWの細胞内cAMP産生抑制活性を中和することができ、摂食促進作用、プロラクチン産生抑制作用、利尿作用、胃酸分泌抑制作用も有する。

- 従って、本発明の抗体は、NPWの作用を抑制することにより、例えば拒食症、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル症候群、アルゴンツ・デル・カスティロ症候群、フォーベス・アルブライト症候群、リンパ腫、シーハン症候群、精子形成異常、腎性浮腫、尿排出障害(例、膀胱収縮障害、尿道通過障害、排尿困難、排尿痛、尿路閉塞など)、低ナトリウム血症、抗利尿ホルモン分泌不適症候群(SIADH)、高血圧、上部消化管疾患(例、消化性潰瘍(例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など)、胃炎、逆流性食道炎、NUD(Non Ulcer Dyspepsia)、胃

癌、胃MALTリンパ腫、非ステロイド系抗炎症剤に起因する潰瘍、胃酸過多、潰瘍など)などの予防・治療剤、摂食(食欲)促進剤などの安全な医薬として使用することができる。

- 5 本発明の抗体を用いる測定法、好ましくはNPWのC端部を特異的に認識するモノクローナル抗体とNPWのN端部を特異的に認識するモノクローナル抗体とを用いるサンドイッチ法による免疫学的測定法などにより、NPWを感度よく特異的に
- 10 定量することができるため、例えば、NPWが関与する疾患〔例、拒食症、肥満症(例、悪性肥満細胞症、外因性肥満、過インシュリン性肥満症、過血漿性肥満、下垂体性肥満、減血漿性肥満症、甲状腺機能低下肥満症、視床下部性肥満、症
- 15 候性肥満症、小児肥満、上半身肥満、食事性肥満症、性機能低下性肥満、全身性肥満細胞症、単純性肥満、中心性肥満など)、下垂体腺腫瘍、間脳腫瘍、月経異常、自己免疫疾患、プロラクチノーマ、不妊症、インポテンス、無月経症、乳汁漏症、末端肥大症、キアリ・フロンメル症候群、アルゴンツ・デル・カステイロ症候群、フォーベス・アルブライト症候群、リンパ腫、シーハン症候群、
- 20 精子形成異常、腎性浮腫、尿排出障害(例、膀胱収縮障害、尿道通過障害、排尿困難、排尿痛、尿路閉塞など)、低ナトリウム血症、抗利尿ホルモン分泌不適症候群(SIADH)、高血圧、蓄尿障害(例、頻尿、尿失禁(例、切迫性尿失禁、腹圧性尿失禁、機能性尿失禁など)など)、多尿症、尿崩症(例、下垂体性尿崩症、腎性尿崩症など)、高ナトリウム血症、代謝性アルカリローシス、低カリウム血症、Cushing症候群、上部消化管疾患(例、消化性潰瘍(例、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、吻合部潰瘍、Zollinger-Ellison症候群など)、胃炎、逆流性食道炎、NUD(Non Ulcer Dyspepsia)、胃癌、胃MALTリンパ腫、非ステロイド系抗炎症剤に起因する潰瘍、胃酸過多、潰瘍など)、消化不良症(例、下垂体性消化不良症、腎性消化不良症など)、骨代謝障害(例、骨粗しょう症、骨軟化
- 25 症など)、貧血症(例、鉄欠乏性貧血など)など〕などの診断ができる。また、本発明の抗体は、NPWの免疫組織染色にも使用可能である。

## 請求の範囲

1. 配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のN端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体。  
5
2. 配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列の第1～13番目のアミノ酸配列を有するペプチドに特異的に反応する請求項1記載の抗体。  
10
3. 配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列の第1～3番目、第1～4番目、第1～5番目、第1～6番目、第1～7番目、第1～8番目、第1～9番目、第2～4番目、第2～5番目、第2～6番目、第2～7番目、第2～8番目、第2～9番目、第3～5番目、第3～6番目、第3～7番目、第3～8番目、第3～9番目、第4～6番目、第4～7番目、第4～8番目、第4～9番目、第5～7番目、第5～8番目、第5～9番目、第6～8番目、第6～9番目および第7～9番目のアミノ酸配列から選ばれる少なくともひとつを含有するペプチドに特異的に反応する請求項1記載の抗体。  
15  
20
4. 配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のC端側の部分ペプチドを認識しない請求項1記載の抗体。
5. 配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドに対して中和活性を有する請求項1記載の抗体。  
25
6. 標識化された請求項1記載の抗体。
7. モノクローナル抗体である請求項1記載の抗体。

8. AhW23N2G6D1 (FERM BP-8363) で標示されるハイブリドーマ細胞から産生され得るAhW23N2G6D1aで標示される請求項7記載の抗体。

5 9. 請求項8記載の抗体の、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対する結合部位に特異的に反応する抗体。

10 10. 配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対して中和活性を有する請求項9記載の抗体。

11. AhW23N3H3E4 (FERM BP-8364) で標示されるハイブリドーマ細胞から産生され得るAhW23N3H3E4aで標示される請求項7記載の抗体。

15 12. 請求項11記載の抗体の、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対する結合部位に特異的に反応する抗体。

20 13. 配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対して中和活性を有する請求項12記載の抗体。

25 14. 配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のC端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体。

15. 配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列の第11～23番目のアミノ酸配列を有するペプチドに特異的に反応する請求項14記載の抗体。

16. 配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で

表されるアミノ酸配列の第16～23番目、第17～23番目、第18～23番目、第19～23番目、第20～23番目、第21～23番目、第16～22番目、第17～22番目、第18～22番目、第19～22番目、第20～22番目、第16～21番目、第17～21番目、第18～21番目、第19～21番目、第16～20番目、第17～20番目および第18～20番目のアミノ酸配列から選ばれる少なくともひとつを含有するペプチドに特異的に反応する請求項14記載の抗体。

17. 配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のN端側の部分ペプチドを認識しない請求項14記載の抗体。

18. 配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドに対して中和活性を有する請求項14記載の抗体。

19. 標識化された請求項14記載の抗体。

20. モノクローナル抗体である請求項14記載の抗体。

21. AhW23C6G1H8 (FERM BP-8365) で標示されるハイブリドーマ細胞から産生され得るAhW23C6G1H8aで標示される請求項20記載の抗体。

22. 請求項21記載の抗体の、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対する結合部位に特異的に反応する抗体。

23. 配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対して中和活性を有する請求項22記載の抗体。

24. AhW23C5G2F6 (FERM BP-8366) で標示されるハイブリドーマ細胞から産生され得るAhW23C5G2F6aで標示される請求項20記載の抗体。

25. 請求項24記載の抗体の、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対

する結合部位に特異的に反応する抗体。

26. 配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対して中和活性を有する請求項25記載の抗体。

5 27. 配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のC端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体。

10 28. 配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列の第16～30番目のアミノ酸配列を有するペプチドに特異的に反応する請求項27記載の抗体。

15 29. 配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列の第23～30番目、第24～30番目、第25～30番目、第26～30番目、第27～30番目、第28～30番目、第23～29番目、第24～29番目、第25～29番目、第26～29番目、第27～29番目、第23～28番目、第24～28番目、第25～28番目、第26～28番目、第23～27番目、第24～27番目および第25～27番目のアミノ酸配列から選ばれる少なくともひとつを含有するペプチドに特異的に反応する請求項27記載の抗体。

20 30. 配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩のN端側の部分ペプチドを認識しない請求項27記載の抗体。

31. 配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドに対して中和活性を有する請求項27記載の抗体。

25 32. 標識化された請求項27記載の抗体。

33. モノクローナル抗体である請求項27記載の抗体。

34. ArW30C3A1A (FERM BP-8367) で標示されるハイブリドーマ細胞から産生され得るArW30C3A1Aaで標示される請求項33記載の抗体。



35. 請求項34記載の抗体の、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対する結合部位に特異的に反応する抗体。
36. 配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対して中和活性を有する請求項35記載の抗体。
37. ArW30C7F2E8 (FERM BP-8368) で標示されるハイブリドーマ細胞から産生され得るArW30C7F2E8aで標示される請求項33記載の抗体。
- 10 38. 請求項37記載の抗体の、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対する結合部位に特異的に反応する抗体。
39. 配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対して中和活性を有する請求項38記載の抗体。
- 15 40. 請求項1、請求項14または請求項27記載の抗体を含有してなる医薬。
41. 不妊症、腎性浮腫、消化性潰瘍または胃酸過多症の予防・治療剤である請求項40記載の医薬。
- 20 42. 請求項1、請求項14および／または請求項27記載の抗体を含有してなる診断薬。
43. 請求項1記載の抗体を用いることを特徴とする配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の定量法。
- 25 44. さらに請求項14または請求項27記載の抗体を用いることを特徴とする請求項43記載の定量法。
45. 請求項14記載の抗体を用いることを特徴とする配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有

するポリペプチドまたはその塩の定量法。

46. 請求項27記載の抗体を用いることを特徴とする配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の定量法。

5 47. 請求項1記載の抗体と、被検液および標識化された配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩とを競合的に反応させ、上記抗体に結合した上記標識化されたポリペプチドまたはその塩の割合を測定することを特徴とする、被検液中

10 の配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の定量法。

48. 請求項14記載の抗体と、被検液および標識化された配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩とを競合的に反応させ、上記抗体に結合した上記標識化されたポリペプチドまたはその塩の割合を測定することを特徴とする、被検液中の配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の定量法。

20 49. 請求項27記載の抗体と、被検液および標識化された配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩とを競合的に反応させ、上記抗体に結合した上記標識化されたポリペプチドまたはその塩の割合を測定することを特徴とする、被検液中の配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の定量法。

25 50. (1) 担体上に不溶化した請求項1記載の抗体、標識化された請求項14記載の抗体および被検液を反応させた後、標識剤の活性を測定する、または(2) 担体上に不溶化した請求項14記載の抗体、標識化された請求項1記

載の抗体および被検液を反応させた後、標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の定量法。

5 51. (1) 担体上に不溶化した請求項1記載の抗体、標識化された請求項27記載の抗体および被検液を反応させた後、標識剤の活性を測定する、または(2) 担体上に不溶化した請求項27記載の抗体、標識化された請求項1記載の抗体および被検液を反応させた後、標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩の定量法。

10 52. 請求項1記載の抗体を用いることを特徴とする配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩が関与する疾患の診断法。

15 53. さらに請求項14または請求項27記載の抗体を用いることを特徴とする請求項52記載の診断法。

54. 請求項14記載の抗体を用いることを特徴とする配列番号：4、配列番号：6、配列番号：8または配列番号：10で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩が関与する疾患の診断法。

20 55. 請求項27記載の抗体を用いることを特徴とする配列番号：5、配列番号：7、配列番号：9または配列番号：11で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはその塩が関与する疾患の診断法。

56. 疾患が、不妊症、腎性浮腫、消化性潰瘍または胃酸過多症である、請求項52～55記載の診断法。

57. 請求項7記載の抗体を産生するハイブリドーマ細胞。

25 58. AhW23N2G6D1 (FERM BP-8363) またはAhW23N3H3E4 (FERM BP-8364) で標示される請求項57記載のハイブリドーマ細胞。

59. 請求項58記載のハイブリドーマ細胞を生体内又は生体外で培養し、その体液または培養物から請求項7記載の抗体を採取することを特徴とする請

求項 7 記載の抗体の製造法。

60. 請求項 20 記載の抗体を産生するハイブリドーマ細胞。

5 61. AhW23C6G1H8 (FERM BP-8365) または AhW23C5G2F6 (FERM BP-8366) で標示される請求項 60 記載のハイブリドーマ細胞。

62. 請求項 61 記載のハイブリドーマ細胞を生体内又は生体外で培養し、その体液または培養物から請求項 20 記載の抗体を採取することを特徴とする請求項 20 記載の抗体の製造法。

63. 請求項 33 記載の抗体を産生するハイブリドーマ細胞。

10 64. ArW30C3A1A (FERM BP-8367) または ArW30C7F2E8 (FERM BP-8368) で標示される請求項 63 記載のハイブリドーマ細胞。

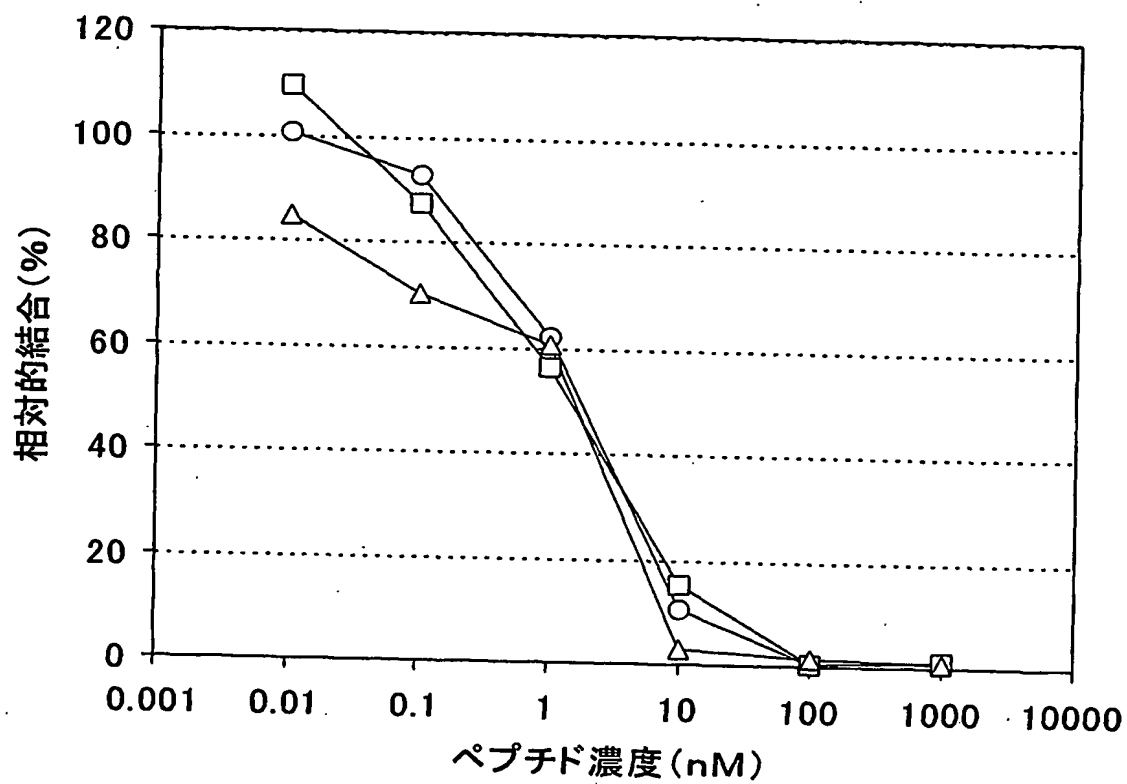
15 65. 請求項 64 記載のハイブリドーマ細胞を生体内又は生体外で培養し、その体液または培養物から請求項 33 記載のモノクローナル抗体を採取することを特徴とする請求項 33 記載の抗体の製造法。

66. 哺乳動物に対し、請求項 1、請求項 14 または請求項 27 記載の抗体の有効量を投与することを特徴とする不妊症、腎性浮腫、消化性潰瘍または胃酸過多症の予防・治療法。

20 67. 不妊症、腎性浮腫、消化性潰瘍または胃酸過多症の予防・治療剤を製造するための請求項 1、請求項 14 または請求項 27 記載の抗体の使用。

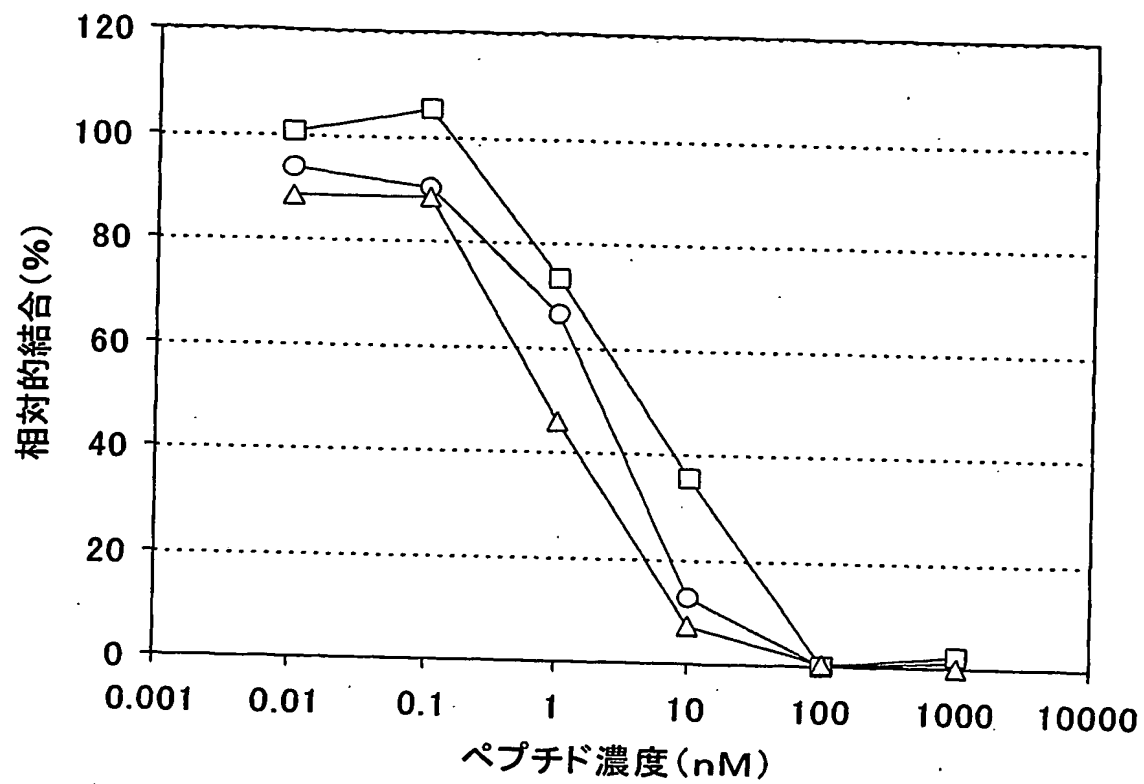
1/28

図 1



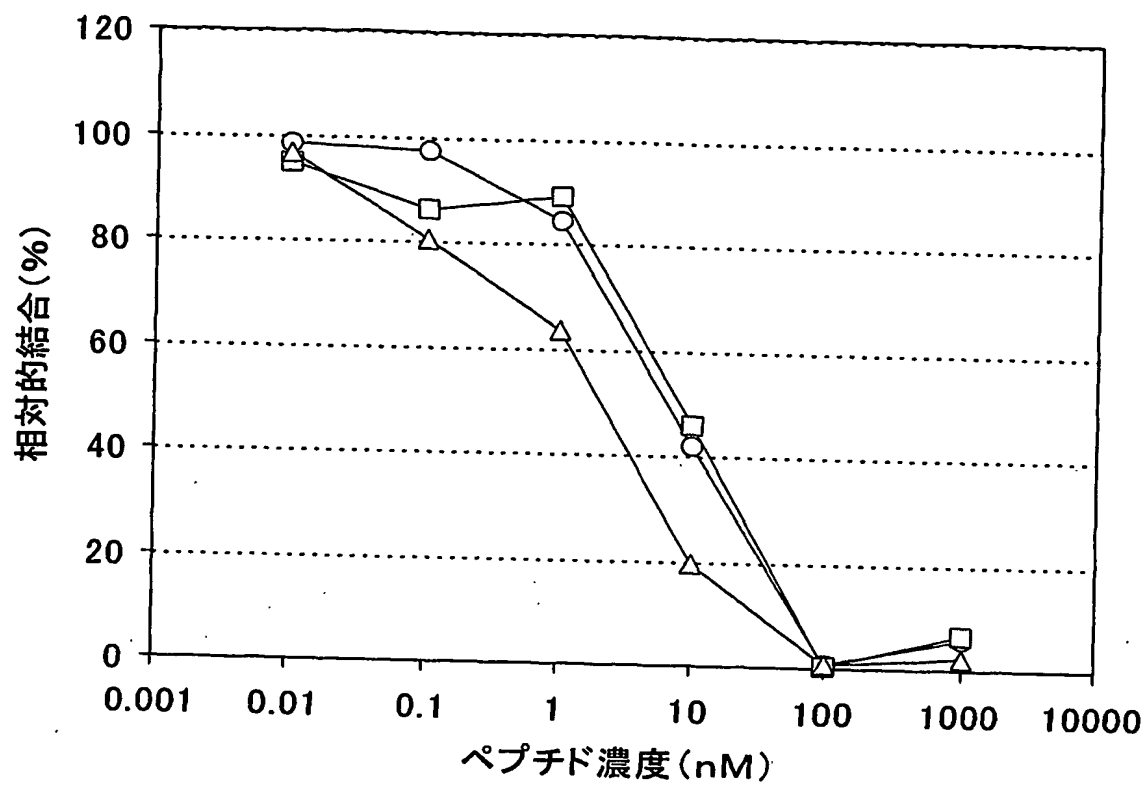
2/28

図 2



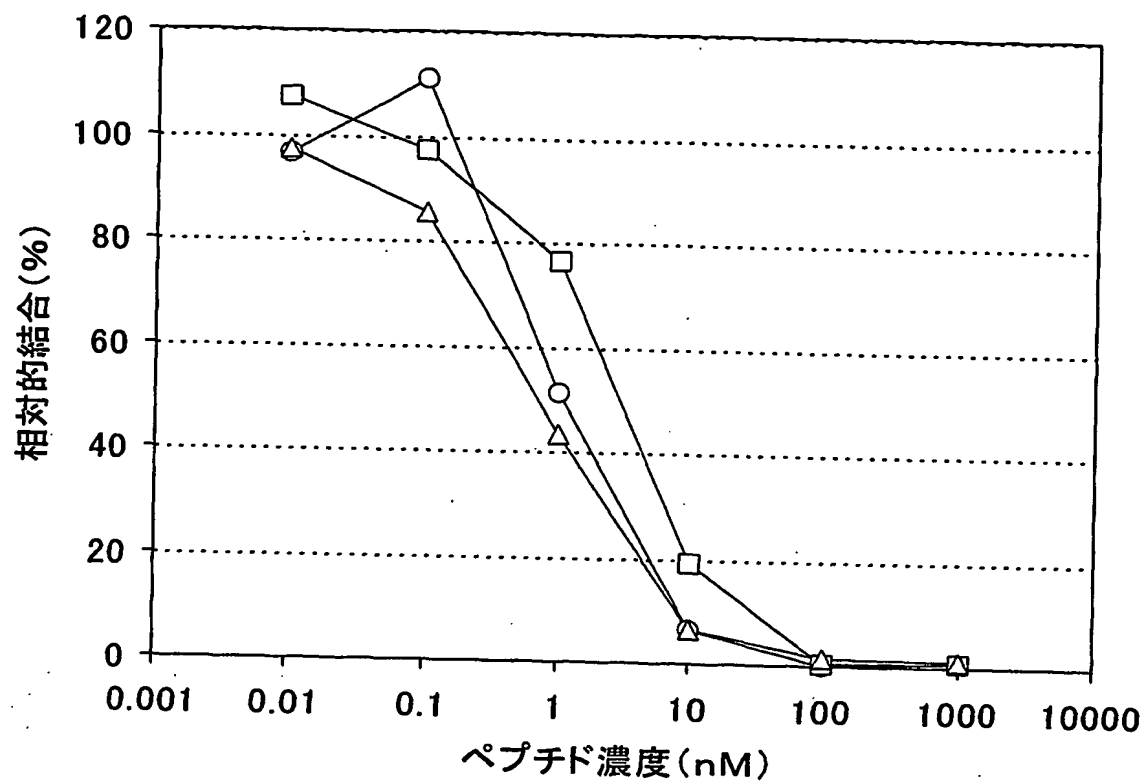
3/28

図 3



4/28

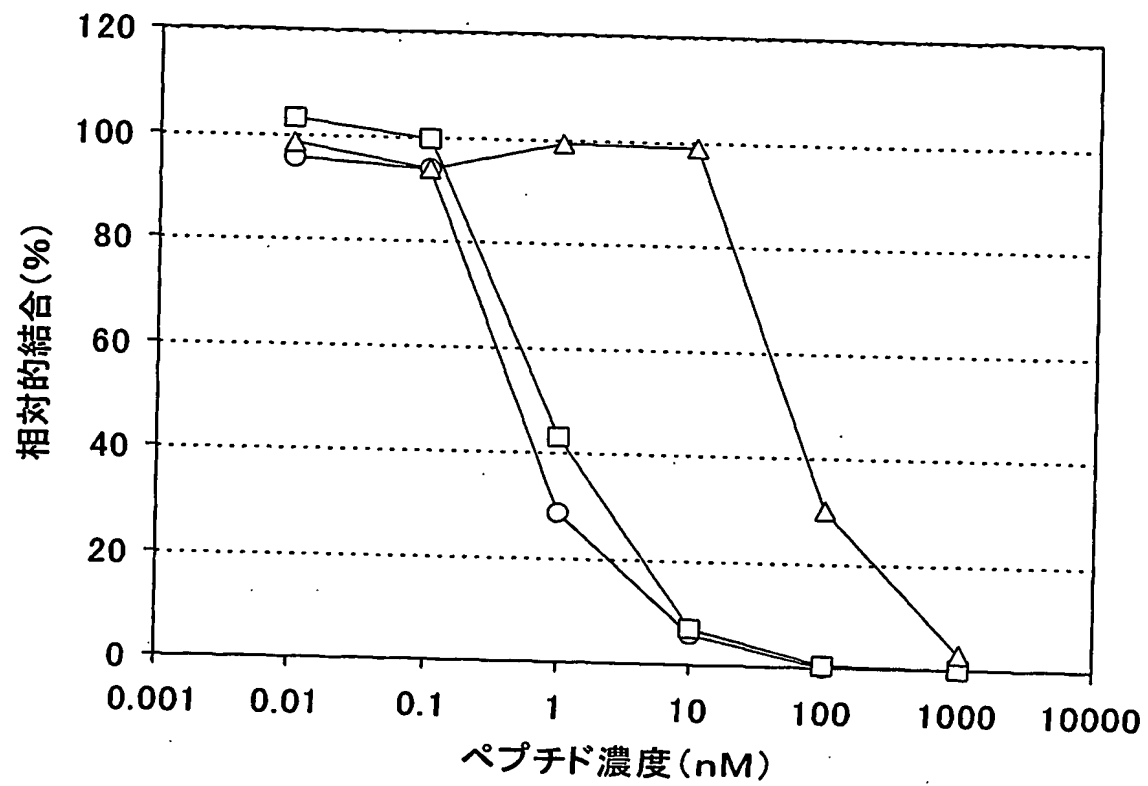
図 4





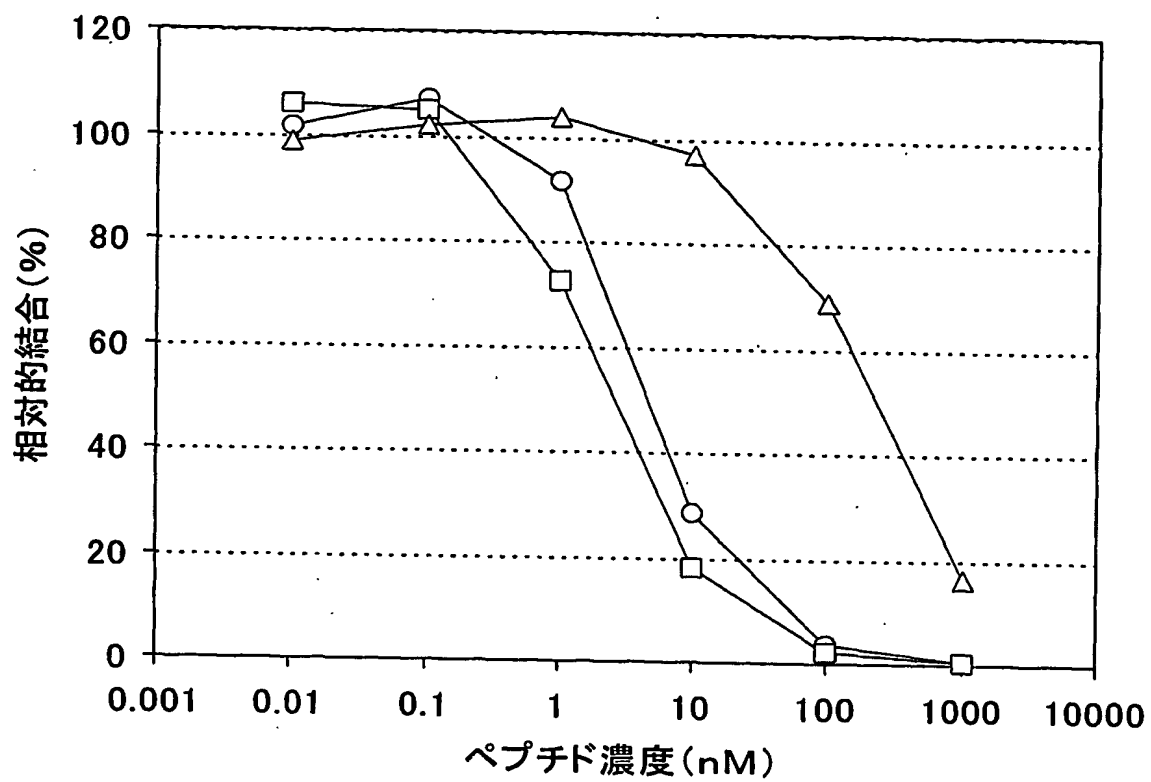
5/28

図 5



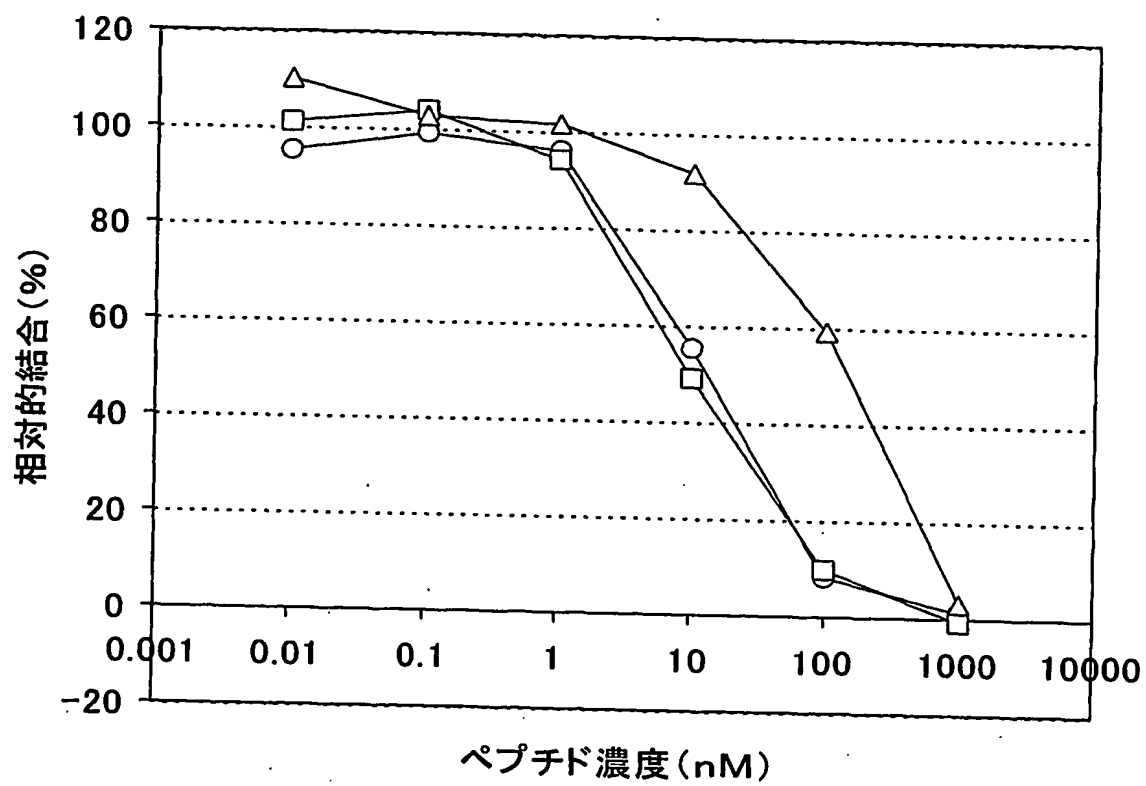
6/28

図 6



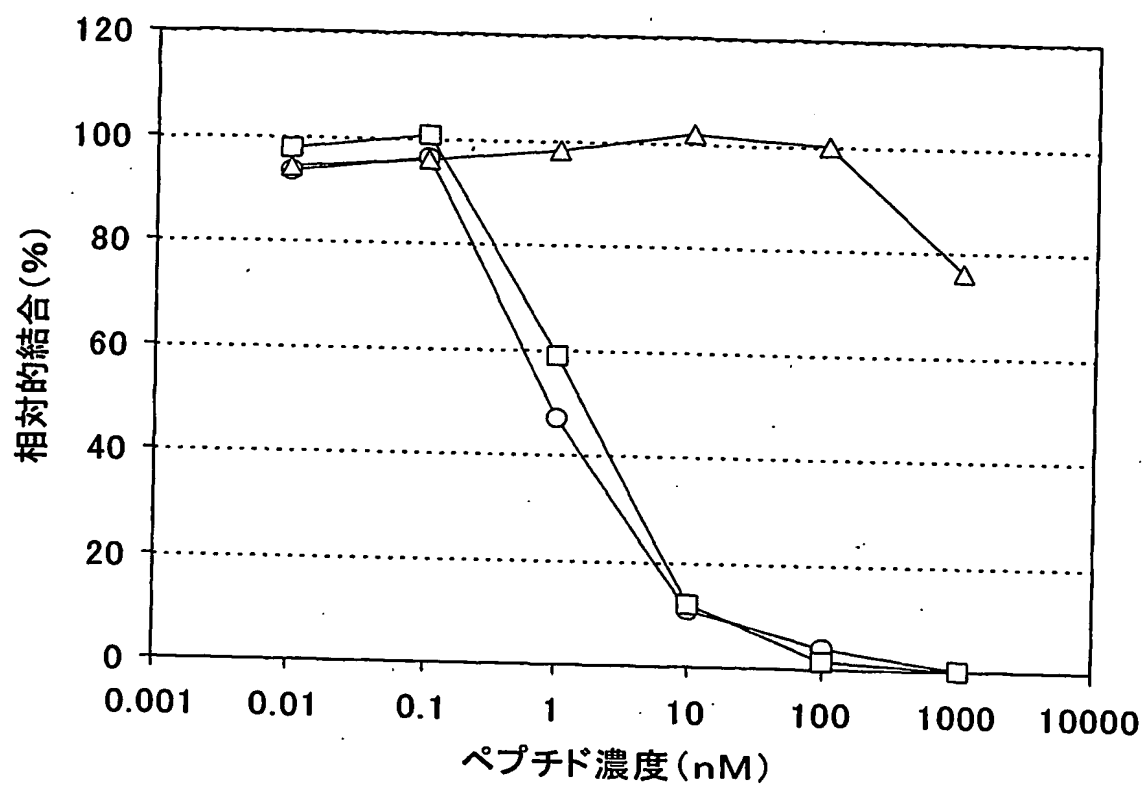
7/28

図 7



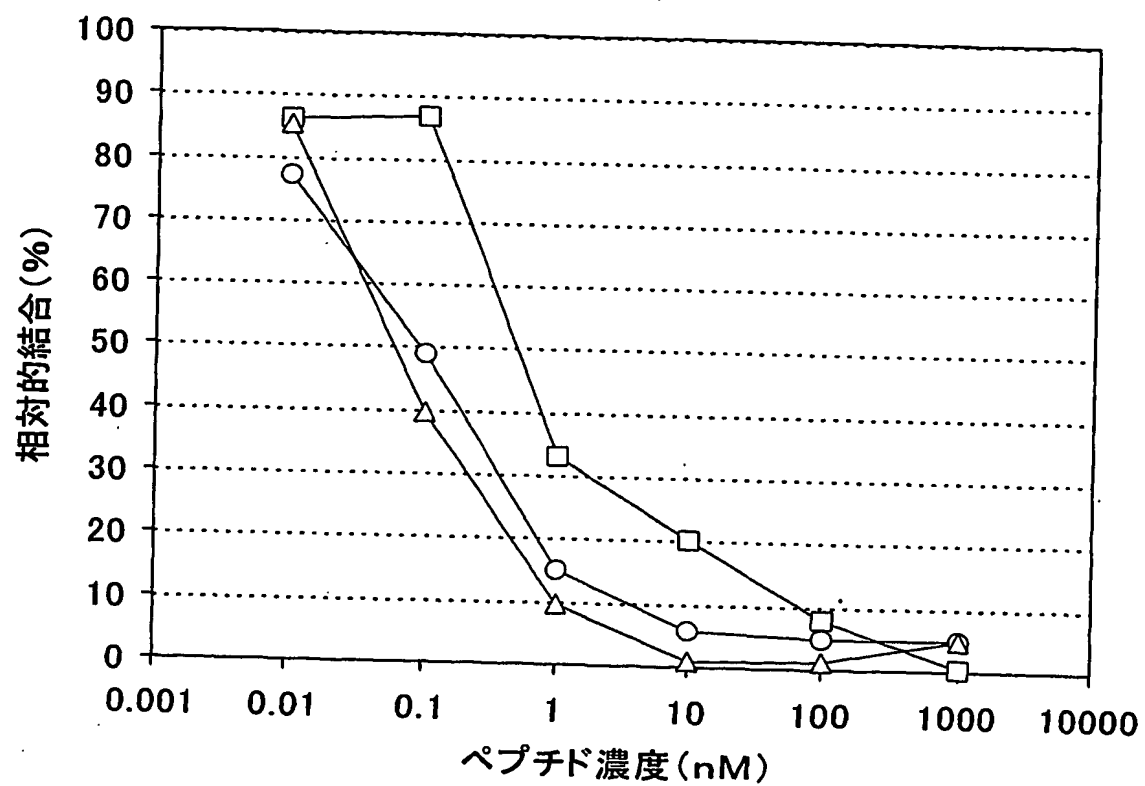
8/28

図 8



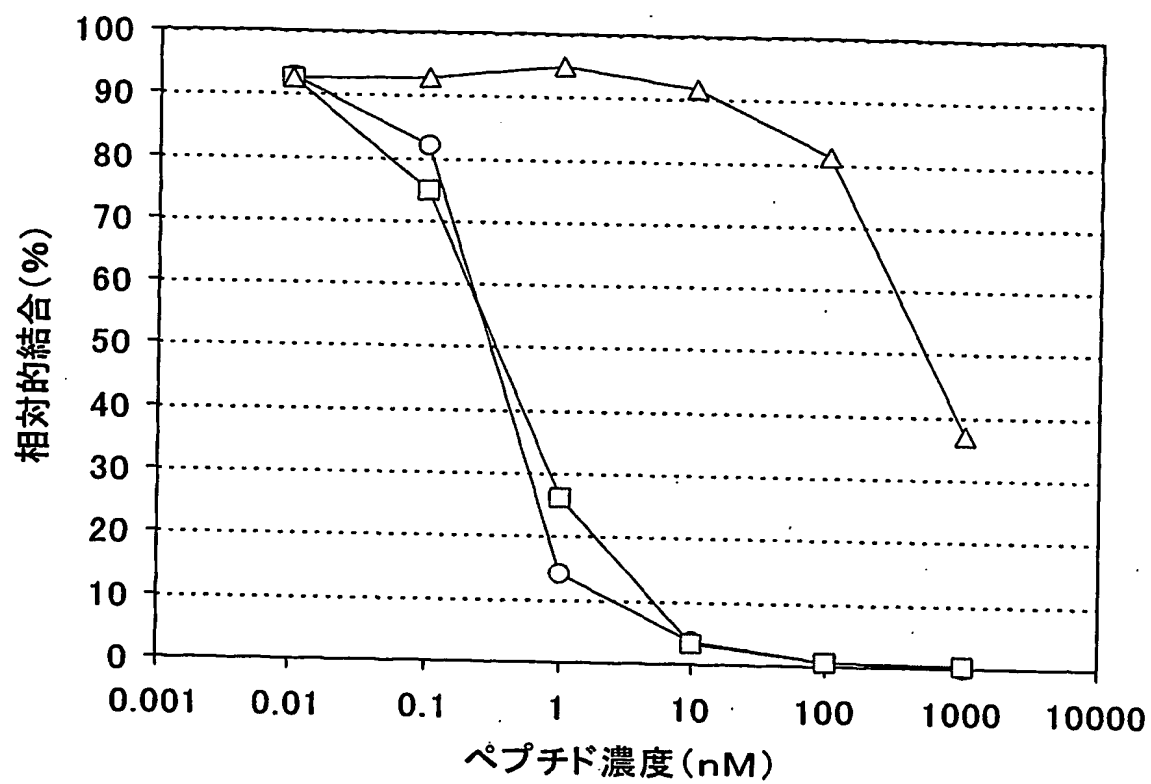
9/28

図 9



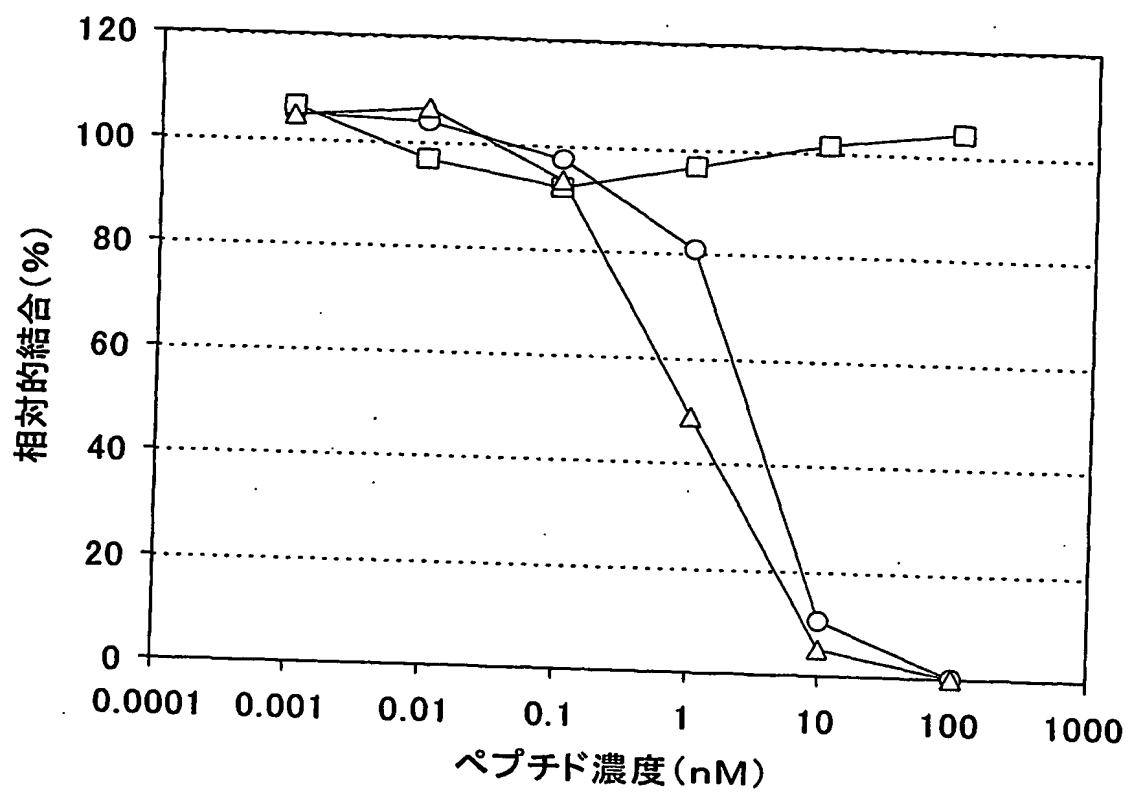
10/28

1 O



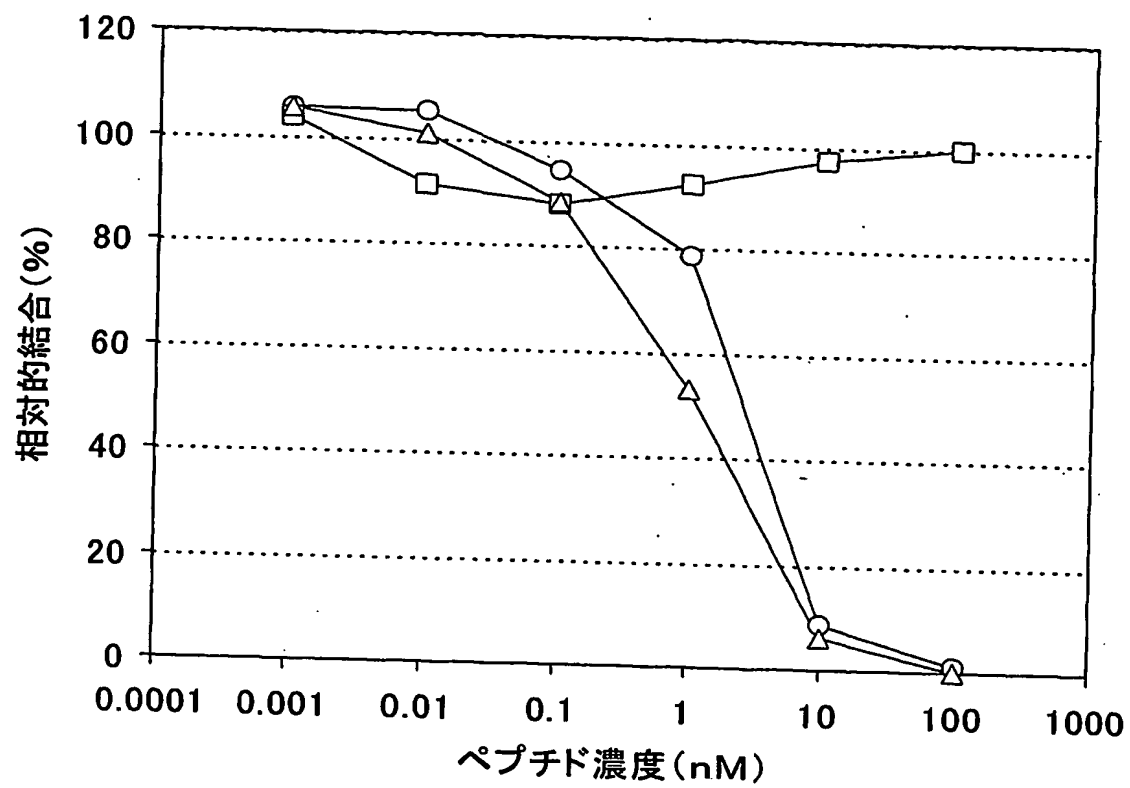
11/28

図 1 1



12/28

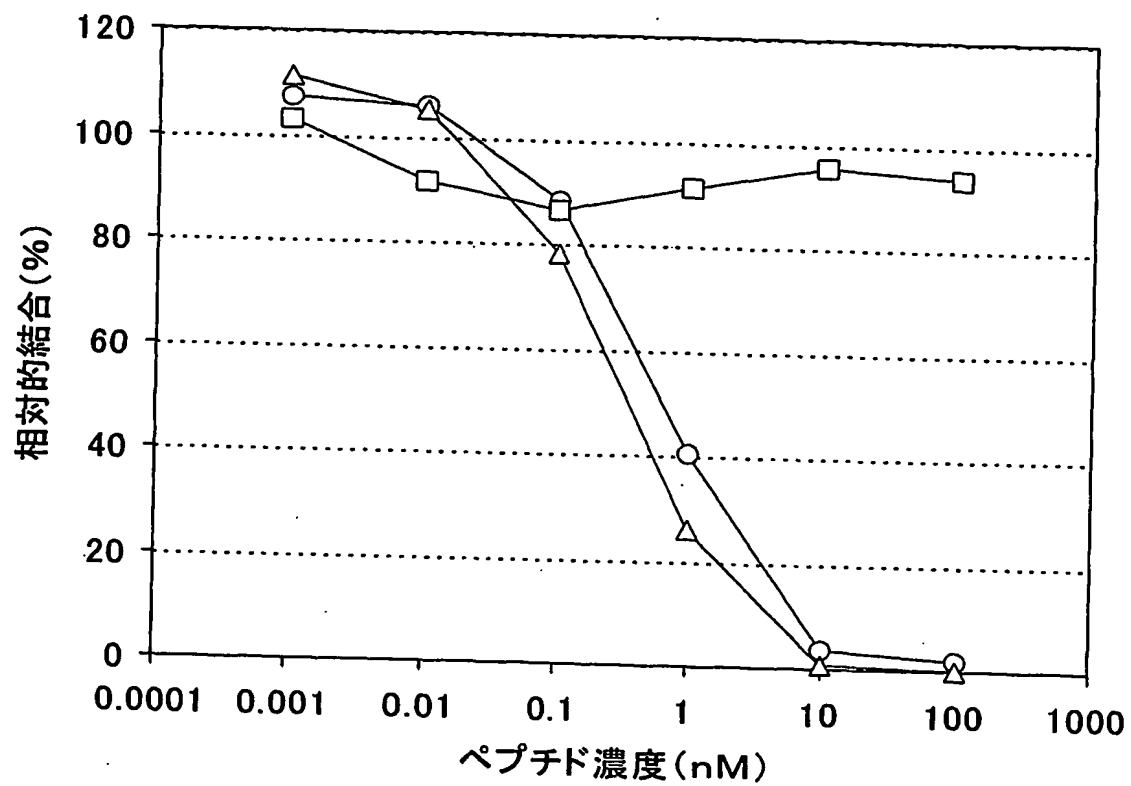
図 1 2





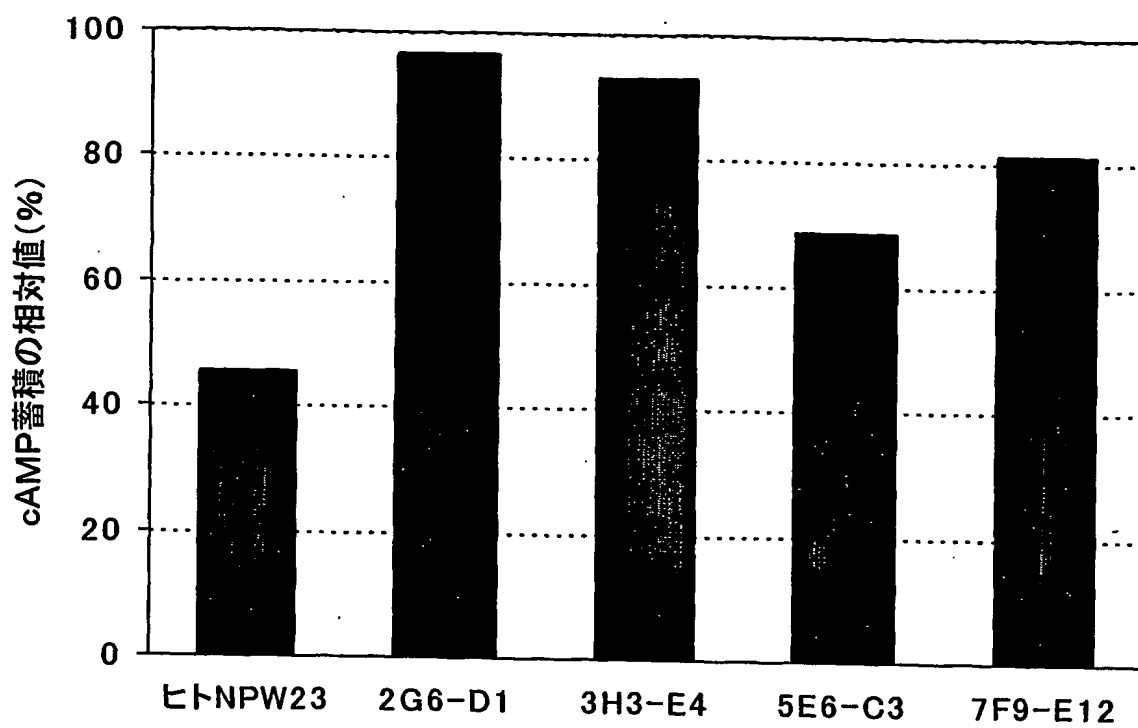
13/28

図 1 3



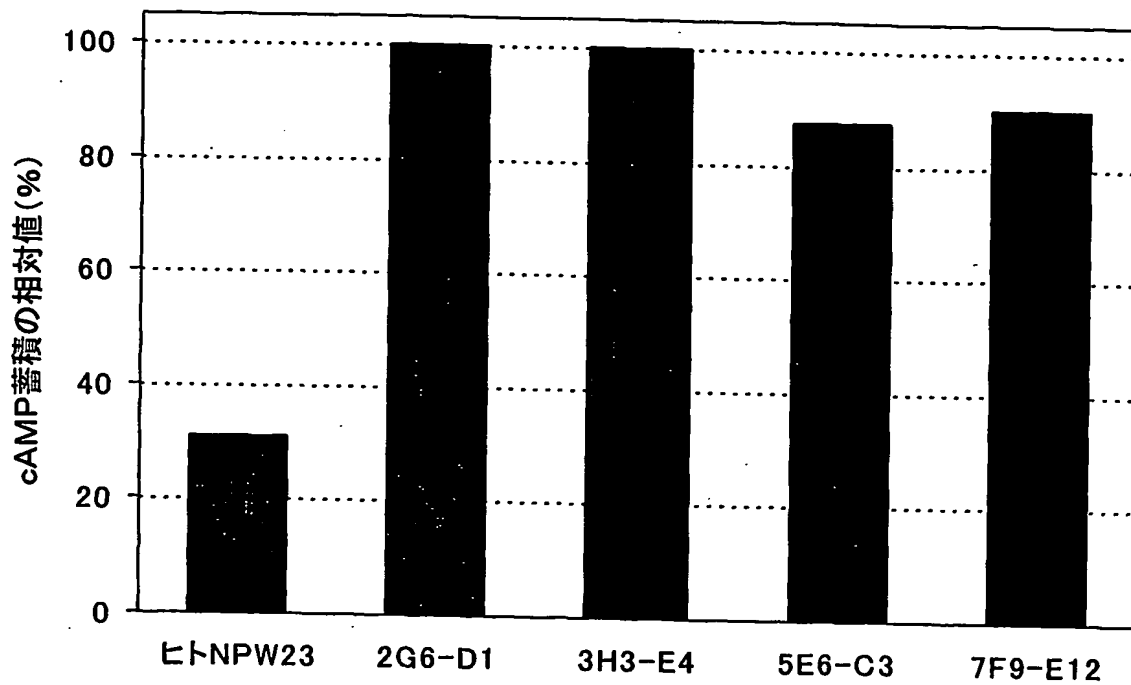
14/28

図 1 4



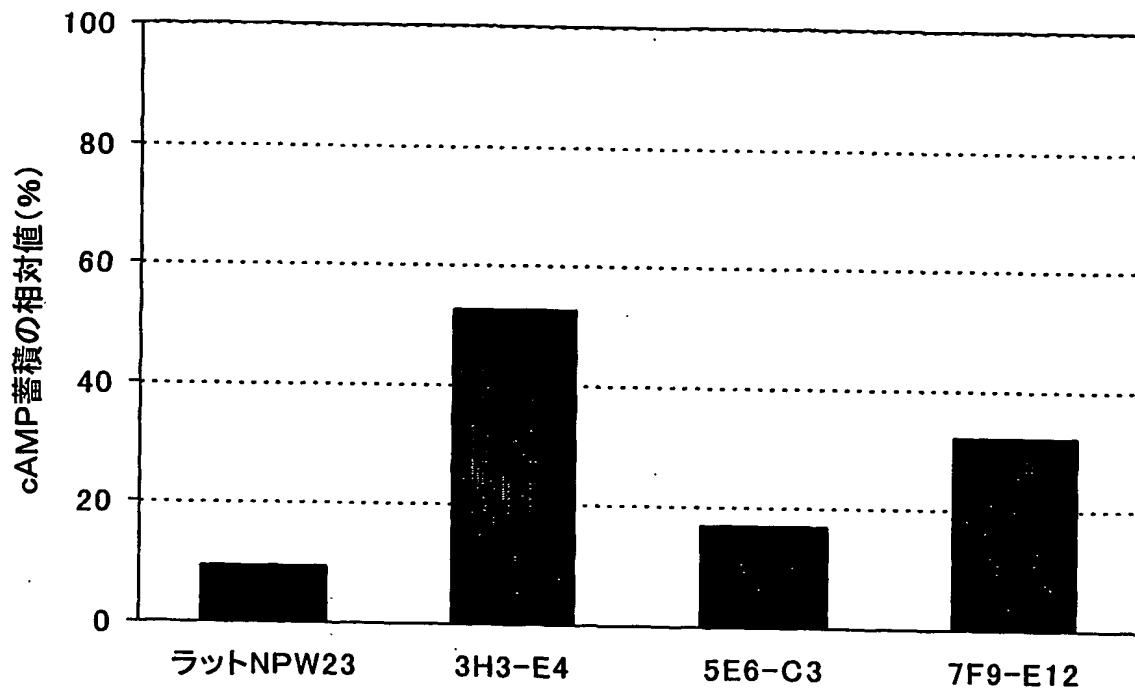
15/28

図 15



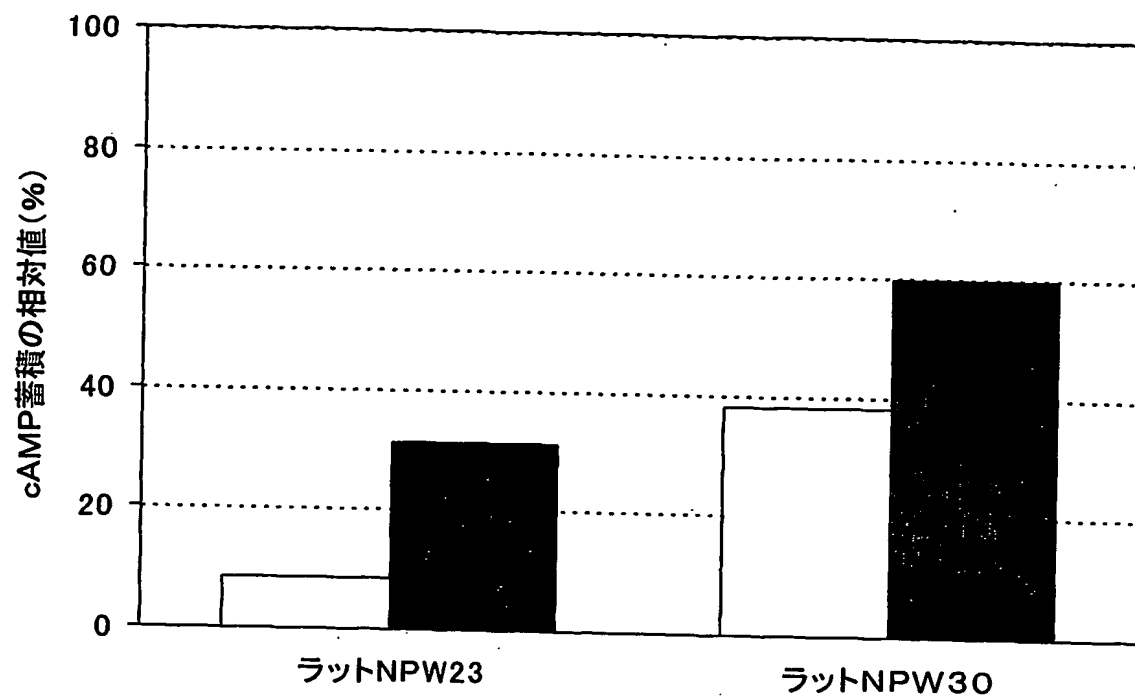
16/28

図 16



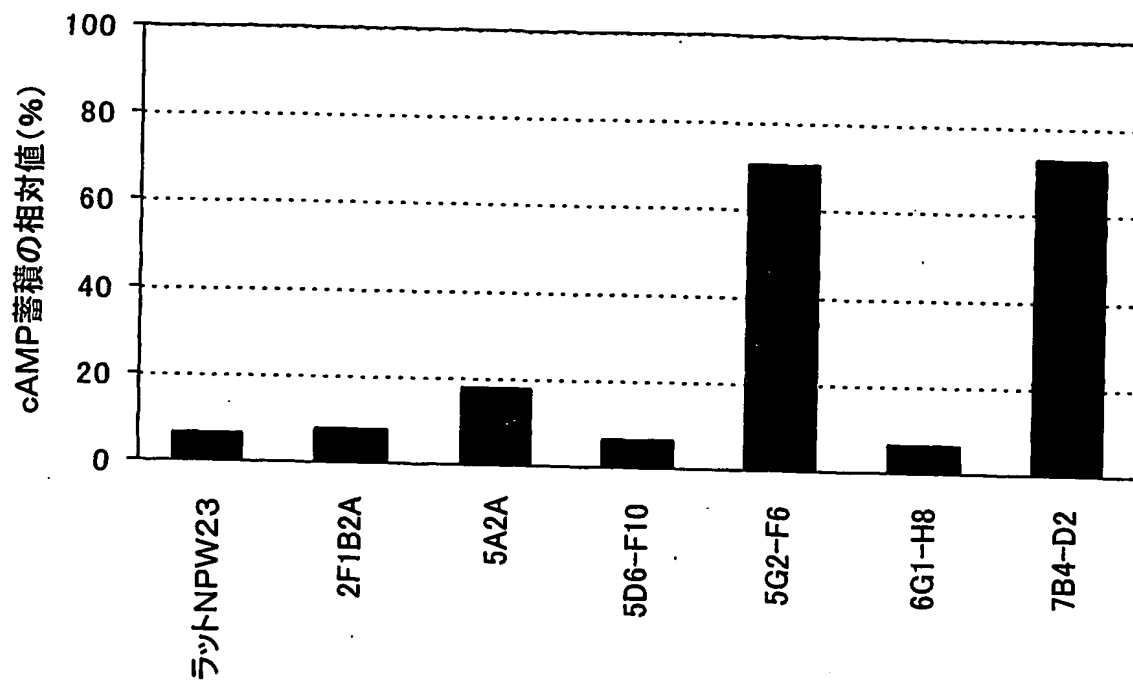
17/28

図 17



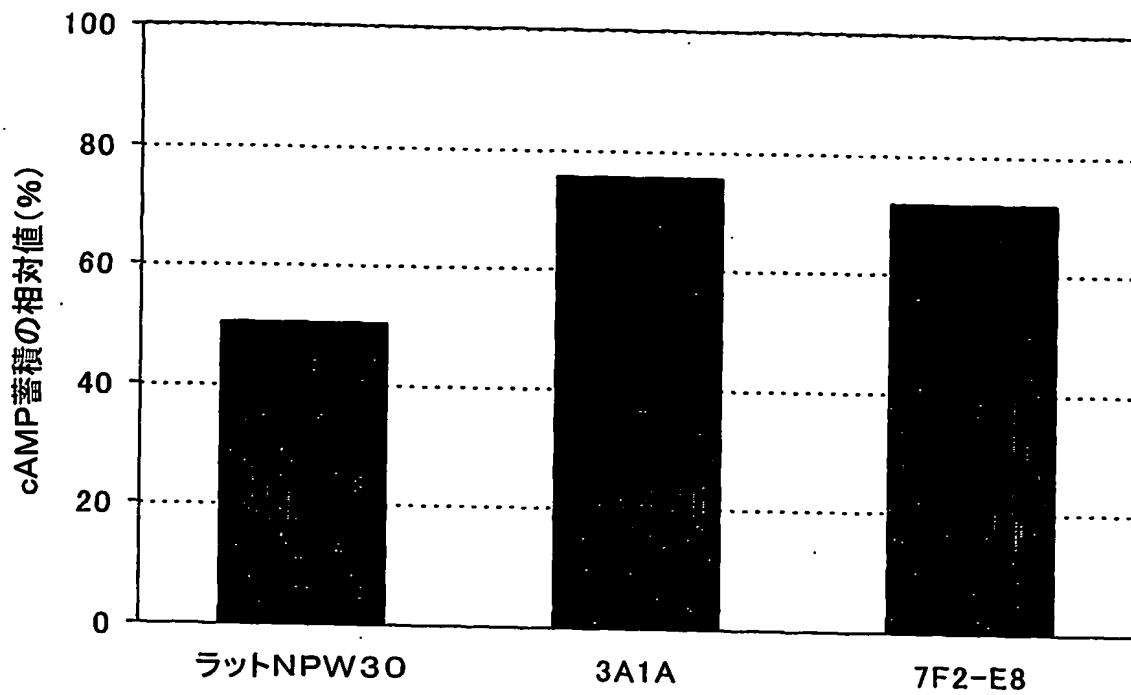
18/28

図 18



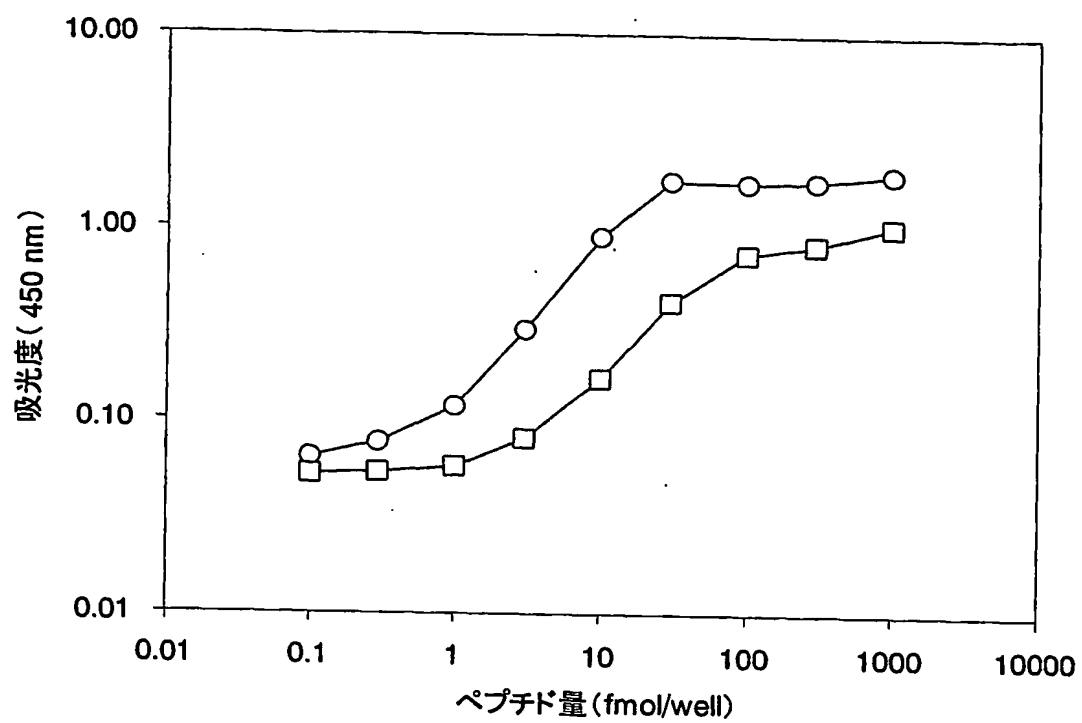
19/28

図 19



20/28

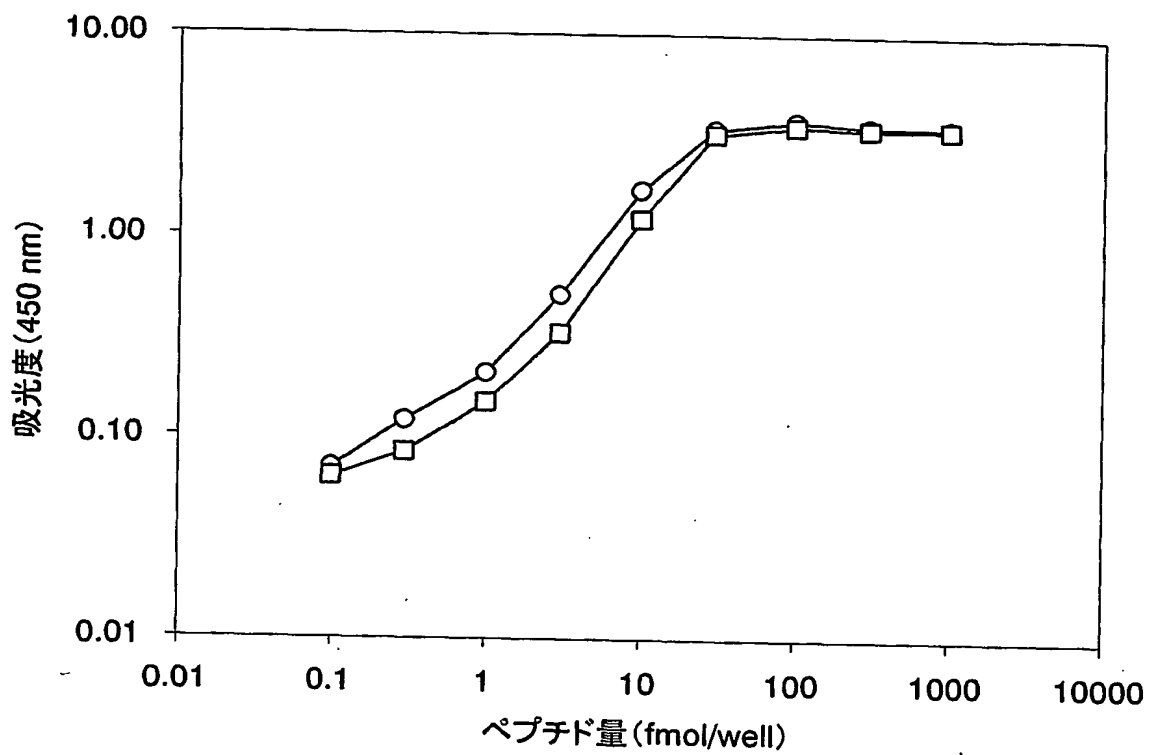
図 20





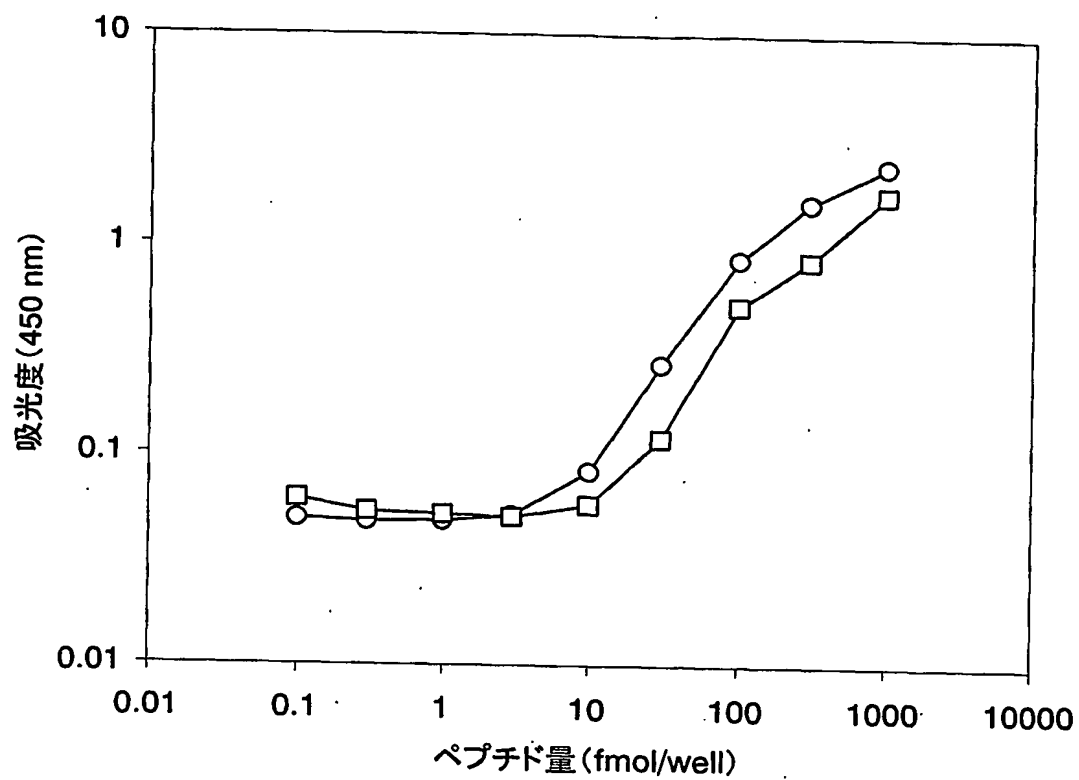
21/28

図 2 1



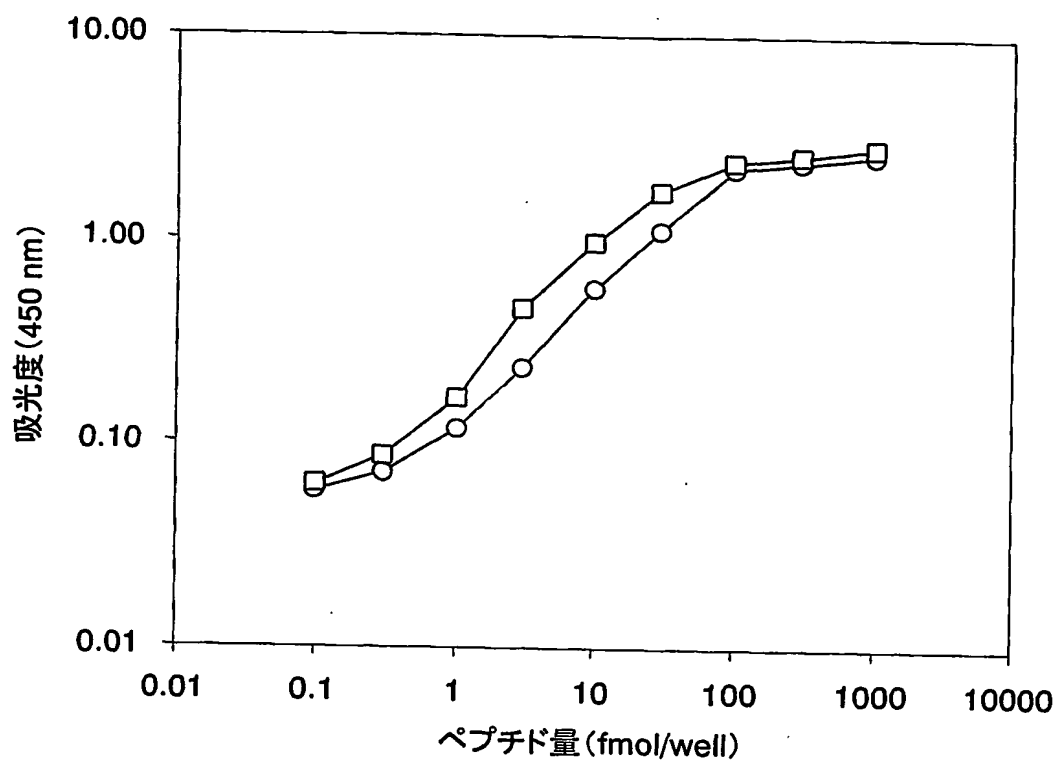
22/28

図 2 2



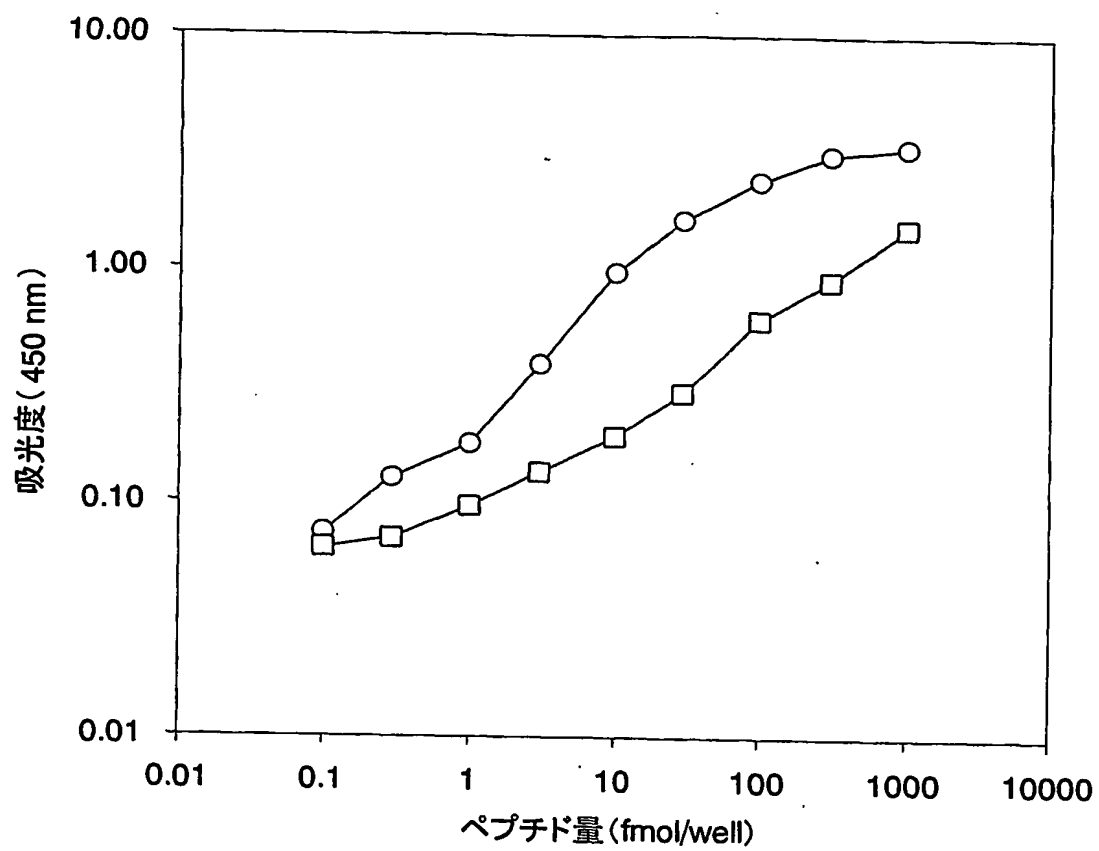
23/28

図 2 3



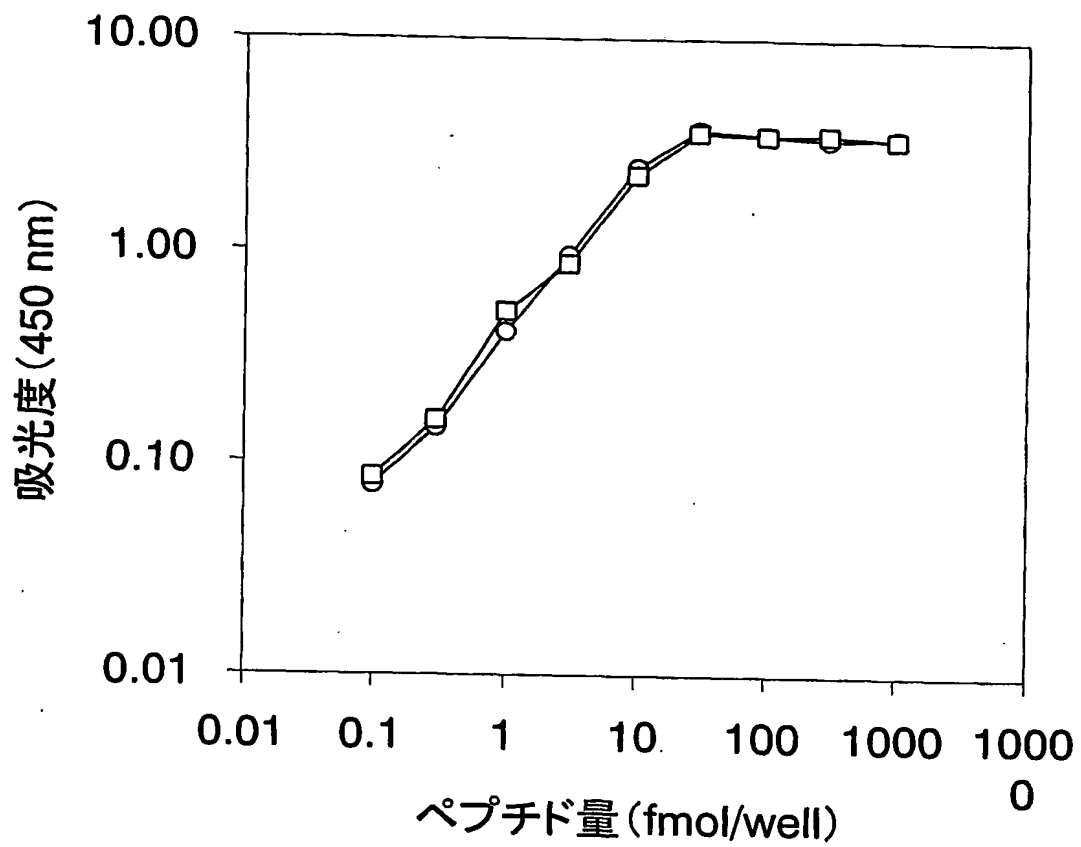
24/28

図 2 4



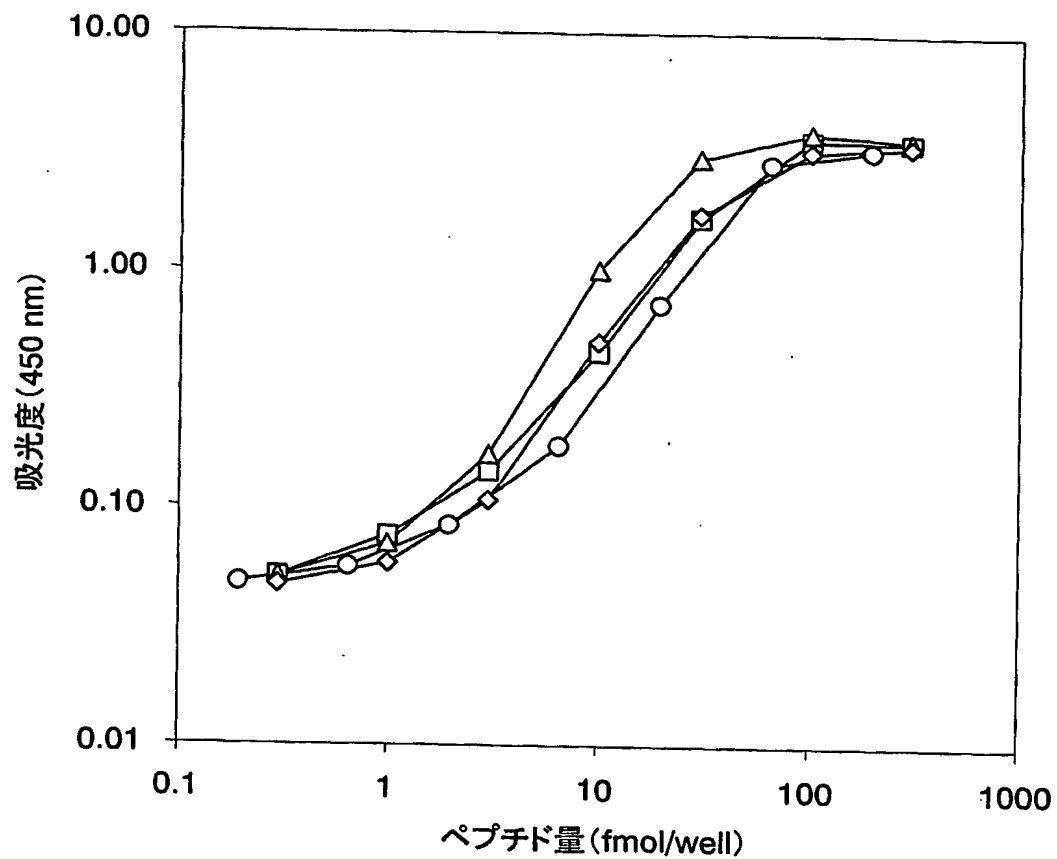
25/28

図 2 5



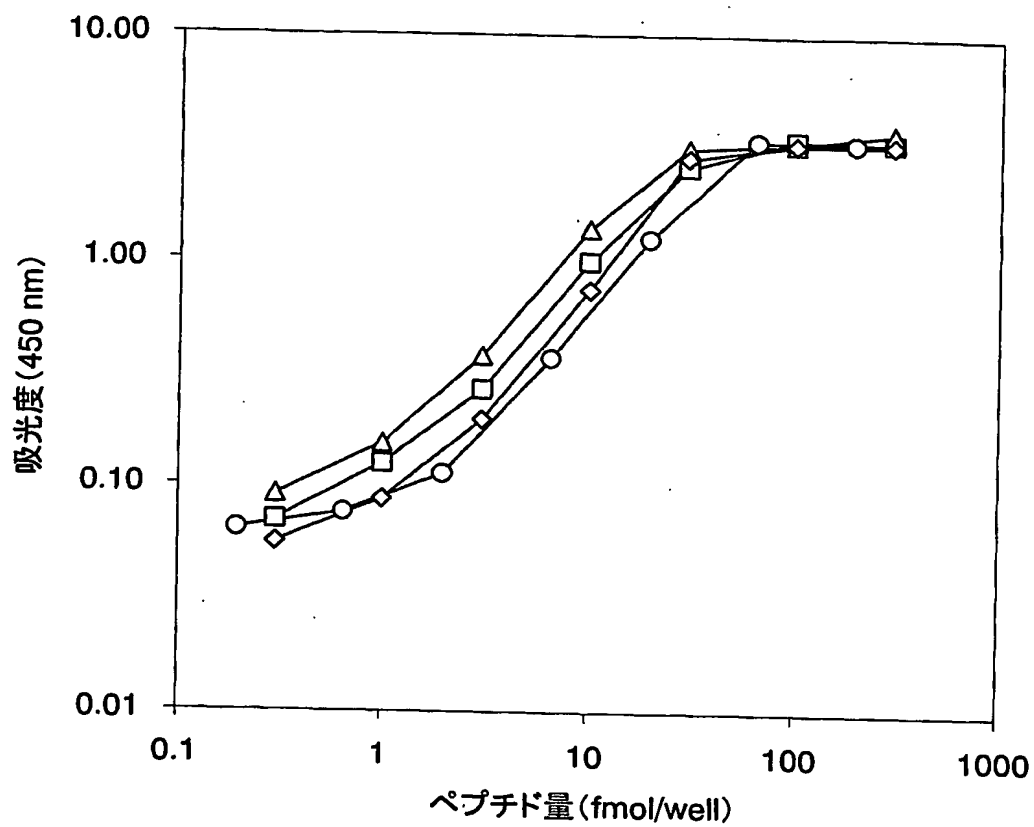
26/28

図 26



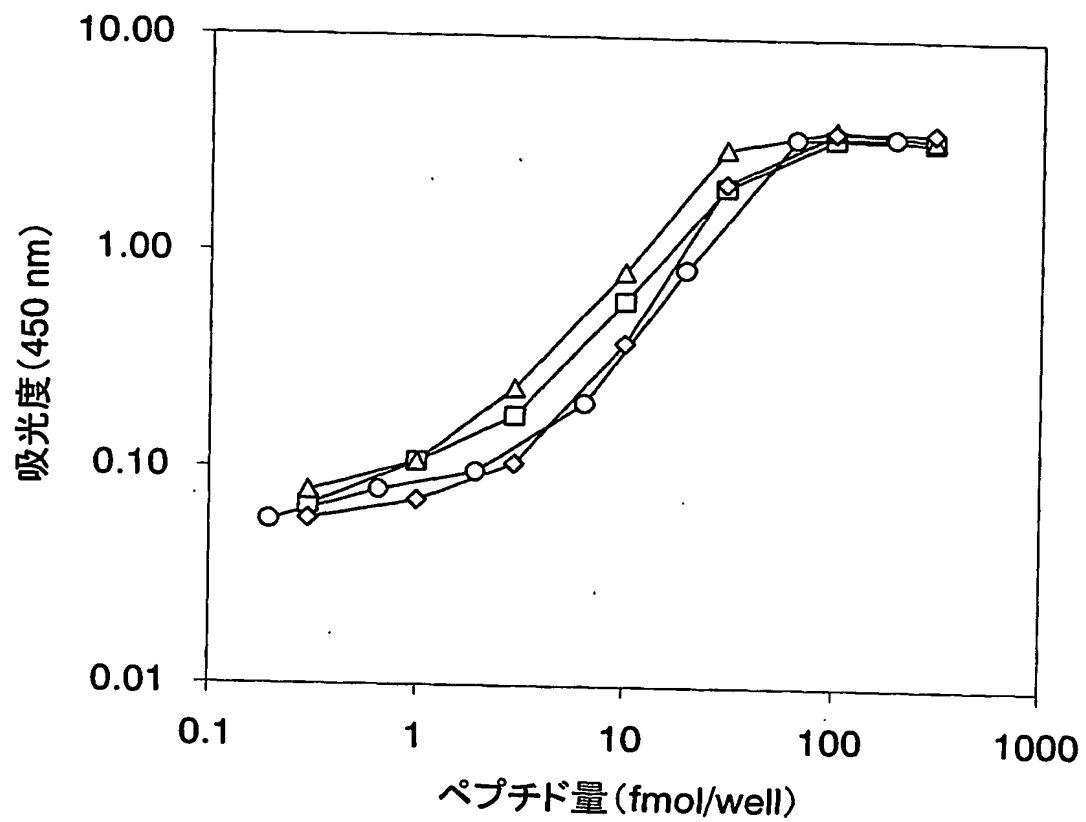
27/28

図 27



28/28

図 28





## SEQUENCE LISTING

<110> Takada Chemical Industries, Ltd.

<120> Antibody and its use

<130> 3175WOOP

<150> JP2003-151577

<151> 2003-05-28

<160> 20

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 1

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Cys

5

10

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 2

Cys His Thr Val Gly Arg Ala Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu

5

10

<210> 3

2/13

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 3

Cys Ala Ser Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr Leu Trp  
5 10 15

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 4

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala  
1 5 10 15  
Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu  
20

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 5

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala  
1 5 10 15  
Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr Leu Trp  
20 25 30

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 23

3/13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 6

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

Ser Gly Leu Leu Met Gly Leu

20

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 7

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

Ser Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr Leu Trp

20 25 30

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 8

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

Ser Gly Leu Leu Met Gly Leu

20

&lt;210&gt; 9

4/13

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 9

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1                      5                      10                      15

Ser Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr Gln Trp

20                      25                      30

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Porcine

&lt;400&gt; 10

Trp Tyr Lys His Thr Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1                      5                      10                      15

Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu

20

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Porcine

&lt;400&gt; 11

Trp Tyr Lys His Thr Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1                      5                      10                      15

Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr Met Trp

20                      25                      30

5/13

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

<213> Artificial Sequence. Xaa means biotin-labeled Cys modified with Biotin  
(Long Arm) Maleimide (Vector Laboratories).

&lt;400&gt; 12

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Xaa

5

10

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

<213> Artificial Sequence. Xaa means biotin-labeled Cys modified with Biotin  
(Long Arm) Maleimide (Vector Laboratories).

&lt;400&gt; 13

Xaa His Thr Val Gly Arg Ala Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu

5

10

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

<213> Artificial Sequence. Xaa means biotin-labeled Cys modified with Biotin  
(Long Arm) Maleimide (Vector Laboratories).

&lt;400&gt; 14

Xaa Ala Ser Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr Leu Trp

5

10

15

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 328

6/13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 15

Met Asp Asn Ala Ser Phe Ser Glu Pro Trp Pro Ala Asn Ala Ser Gly  
1                      5                      10                      15

Pro Asp Pro Ala Leu Ser Cys Ser Asn Ala Ser Thr Leu Ala Pro Leu  
                    20                      25                      30

Pro Ala Pro Leu Ala Val Ala Val Pro Val Val Tyr Ala Val Ile Cys  
                    35                      40                      45

Ala Val Gly Leu Ala Gly Asn Ser Ala Val Leu Tyr Val Leu Leu Arg  
                    50                      55                      60

Ala Pro Arg Met Lys Thr Val Thr Asn Leu Phe Ile Leu Asn Leu Ala  
65                      70                      75                      80

Ile Ala Asp Glu Leu Phe Thr Leu Val Leu Pro Ile Asn Ile Ala Asp  
                    85                      90                      95

Phe Leu Leu Arg Gln Trp Pro Phe Gly Glu Leu Met Cys Lys Leu Ile  
                    100                      105                      110

Val Ala Ile Asp Gln Tyr Asn Thr Phe Ser Ser Leu Tyr Phe Leu Thr  
                    115                      120                      125

Val Met Ser Ala Asp Arg Tyr Leu Val Val Leu Ala Thr Ala Glu Ser  
                    130                      135                      140

Arg Arg Val Ala Gly Arg Thr Tyr Ser Ala Ala Arg Ala Val Ser Leu  
145                      150                      155                      160

Ala Val Trp Gly Ile Val Thr Leu Val Val Leu Pro Phe Ala Val Phe  
                    165                      170                      175

Ala Arg Leu Asp Asp Glu Gln Gly Arg Arg Gln Cys Val Leu Val Phe  
                    180                      185                      190

Pro Gln Pro Glu Ala Phe Trp Trp Arg Ala Ser Arg Leu Tyr Thr Leu  
                    195                      200                      205

7/13

Val Leu Gly Phe Ala Ile Pro Val Ser Thr Ile Cys Val Leu Tyr Thr  
 210 215 220  
 Thr Leu Leu Cys Arg Leu His Ala Met Arg Leu Asp Ser His Ala Lys  
 225 230 235 240  
 Ala Leu Glu Arg Ala Lys Lys Arg Val Thr Phe Leu Val Val Ala Ile  
 245 250 255  
 Leu Ala Val Cys Leu Leu Cys Trp Thr Pro Tyr His Leu Ser Thr Val  
 260 265 270  
 Val Ala Leu Thr Thr Asp Leu Pro Gln Thr Pro Leu Val Ile Ala Ile  
 275 280 285  
 Ser Tyr Phe Ile Thr Ser Leu Ser Tyr Ala Asn Ser Cys Leu Asn Pro  
 290 295 300  
 Phe Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Ala Ser Phe Arg Arg Asn Leu Arg Gln  
 305 310 315 320  
 Leu Ile Thr Cys Arg Ala Ala Ala  
 325

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 984

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 16

atggacaacg cctcgttctc ggagccctgg cccgccaacg catcggggccc ggaccggcg 60  
 ctgagctgct ccaacgcgtc gactctggcg ccgctgccgg cgccgctggc ggtggctgta 120  
 ccagttgtct acgcgggat ctgcgccgtg ggtctggcgg gcaactccgc cgtgctgtac 180  
 gtgttgctgc gggcgccccg catgaagacc gtcaccaacc tgttcattcct caacctggcc 240  
 atcgccgacg agctcttcac gctgggtgctg cccatcaaca tcgccgactt cctgctgcgg 300  
 cagtggccct tcggggagct catgtgcaag ctcatcgtgg ctatcgacca gtacaacacc 360  
 ttctccagcc tctacttcct caccgtcatg agcgccgacc gctacctggt ggtgttgccc 420

8/13

```

actgcggagt cgcgccgggt ggccggccgc acctacagcg ccgcgcgcgc ggtgagccig 480
gccgltggg ggatcgtcac acicgtcgtg ctgcccttcg cagtccttcgc ccggctagac 540
gacgagcagg gccggcgcca gtgcgtgcta gtccttcgc agcccgaggc ctctcgggtg 600
cgcgcgagcc gccctacac gctcgtcgtg ggcttcgcca tccccgtgtc caccatctgt 660
gtcctctata ccacctgct gtgccggctg catgccatgc ggctggacag ccacgccaag 720
gccctggagc gcgccaagaa gcgggtgacc ttcctgggtg tggcaatcct ggcggtgtgc 780
ctcctctgct ggacgcccta ccacctgagc accgtgggtg cgctcaccac cgacctcccg 840
cagacgccgc tggtcacgc tatctcctac ttcacacca gcctgagcta cgccaacagc 900
tgcccaacc ccttctctta cgccttcctg gacgccagct tccgcaggaa cctccgccag 960
ctgataactt gccgcgcggc agcc 984

```

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 333

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 17

```

Met Gln Ala Ala Gly His Pro Glu Pro Leu Asp Ser Arg Gly Ser Phe
1           5           10           15
Ser Leu Pro Thr Met Gly Ala Asn Val Ser Gln Asp Asn Gly Thr Gly
           20           25           30
His Asn Ala Thr Phe Ser Glu Pro Leu Pro Phe Leu Tyr Val Leu Leu
           35           40           45
Pro Ala Val Tyr Ser Gly Ile Cys Ala Val Gly Leu Thr Gly Asn Thr
           50           55           60
Ala Val Ile Leu Val Ile Leu Arg Ala Pro Lys Met Lys Thr Val Thr
65           70           75           80
Asn Val Phe Ile Leu Asn Leu Ala Val Ala Asp Gly Leu Phe Thr Leu
           85           90           95
Val Leu Pro Val Asn Ile Ala Glu His Leu Leu Gln Tyr Trp Pro Phe

```



9/13

|   |                                 |     |
|---|---------------------------------|-----|
| 100                                     | 105                             | 110 |
| Gly Glu Leu Leu Cys Lys Leu Val         | Leu Ala Val Asp His Tyr Asn Ile |     |
| 115                                     | 120                             | 125 |
| Phe Ser Ser Ile Tyr Phe Leu Ala Val     | Met Ser Val Asp Arg Tyr Leu     |     |
| 130                                     | 135                             | 140 |
| Val Val Leu Ala Thr Val Arg Ser Arg His | Met Pro Trp Arg Thr Tyr         |     |
| 145                                     | 150                             | 155 |
| Arg Gly Ala Lys Val Ala Ser Leu Cys Val | Trp Leu Gly Val Thr Val         |     |
| 165                                     | 170                             | 175 |
| Leu Val Leu Pro Phe Phe Ser Phe Ala Gly | Val Tyr Ser Asn Glu Leu         |     |
| 180                                     | 185                             | 190 |
| Gln Val Pro Ser Cys Gly Leu Ser Phe Pro | Trp Pro Glu Gln Val Trp         |     |
| 195                                     | 200                             | 205 |
| Phe Lys Ala Ser Arg Val Tyr Thr Leu Val | Leu Gly Phe Val Leu Pro         |     |
| 210                                     | 215                             | 220 |
| Val Cys Thr Ile Cys Val Leu Tyr Thr Asp | Leu Leu Arg Arg Leu Arg         |     |
| 225                                     | 230                             | 235 |
| Ala Val Arg Leu Arg Ser Gly Ala Lys Ala | Leu Gly Lys Ala Arg Arg         |     |
| 245                                     | 250                             | 255 |
| Lys Val Thr Val Leu Val Leu Val Val Leu | Ala Val Cys Leu Leu Cys         |     |
| 260                                     | 265                             | 270 |
| Trp Thr Pro Phe His Leu Ala Ser Val Val | Ala Leu Thr Thr Asp Leu         |     |
| 275                                     | 280                             | 285 |
| Pro Gln Thr Pro Leu Val Ile Ser Met Ser | Tyr Val Ile Thr Ser Leu         |     |
| 290                                     | 295                             | 300 |
| Ser Tyr Ala Asn Ser Cys Leu Asn Pro Phe | Leu Tyr Ala Phe Leu Asp         |     |
| 305                                     | 310                             | 315 |
| Asp Asn Phe Arg Lys Asn Phe Arg Ser Ile | Leu Arg Cys                     |     |
| 325                                     | 330                             |     |

10/13

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 999

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 18

```
atgcaggccg ctgggcaccc agagccccctt gacagcaggg gctccttctc cctccccacg 60
atgggtgcca acgtctctca ggacaatggc actggccaca atgccaccit ctccgagcca 120
ctgccgttcc tctatgtgct cctgcccgcc gtgtactccg ggatctgtgc tggggggctg 180
actggcaaca cggccgtcat ccttgtaatc ctaagggcgc ccaagatgaa gacggtigacc 240
aacgtgttca tcctgaacct ggccgtcgcc gacgggctct tcacgtggt actgcccgtc 300
aacatcgccg agcacctgct gcagtactgg cccttcgggg agctgctctg caagctggtg 360
ctggccgtcg accaclacaa catcttctcc agcatctact tcctagccgt gatgagcgtg 420
gaccgatacc tgggtggctg ggccaccgtg aggtcccgcc acatgccctg ggcacacctac 480
cggggggcga aggtcgccag cctgtgtgtc tggctggggc tcacggctct ggttctgccc 540
ttcttctctt tcgtggcgt ctacagcaac gagctgcagg tccaagctg tgggctgagc 600
ttcccgtggc ccgagcaggt ctggttcaag gccagccgtg tctacacggt ggtcctgggc 660
ttcgtgctgc ccgtgtgcac catctgtgtg ctctacacag acctccigcg caggctgcgg 720
gccgtgcggc tccgctctgg agccaaggct ctaggcaagg ccaggcgga ggtgaccgtc 780
ctggctctcg tcgtgctggc cgigtgcctc ctctgctgga cgcccttcca cctggcctct 840
gtcgtggccc tgaccacgga cctgccccag accccactgg tcatcagtat gtcctacgtc 900
atcaccagcc tcagctacgc caactcgtgc ctgaacccct tcctctacgc ctttctagat 960
gacaacttcc ggaagaactt ccgcagcata ttgcggtgc 999
```

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 329

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 19

11/13

Met His Asn Leu Ser Leu Phe Glu Pro Gly Arg Gly Asn Val Ser Cys  
 5 10 15  
 Gly Gly Pro Phe Leu Gly Cys Pro Asn Glu Ser Asn Pro Ala Pro Leu  
 20 25 30  
 Pro Leu Pro Gln Pro Leu Ala Val Ala Val Pro Val Val Tyr Gly Val  
 35 40 45  
 Ile Cys Ala Val Gly Leu Ala Gly Asn Ser Ala Val Leu Tyr Val Leu  
 50 55 60  
 Leu Arg Thr Pro Arg Met Lys Thr Val Thr Asn Val Phe Ile Leu Asn  
 65 70 75 80  
 Leu Ala Ile Ala Asp Glu Leu Phe Thr Leu Val Leu Pro Ile Asn Ile  
 85 90 95  
 Ala Asp Phe Leu Leu Arg Arg Trp Pro Phe Gly Glu Val Met Cys Lys  
 100 105 110  
 Leu Ile Val Ala Val Asp Gln Tyr Asn Thr Phe Ser Ser Leu Tyr Phe  
 115 120 125  
 Leu Ala Val Met Ser Ala Asp Arg Tyr Leu Val Val Leu Ala Thr Ala  
 130 135 140  
 Glu Ser Arg Arg Val Ser Gly Arg Thr Tyr Gly Ala Ala Arg Ala Val  
 145 150 155 160  
 Ser Leu Ala Val Trp Ala Leu Val Thr Leu Val Val Leu Pro Phe Ala  
 165 170 175  
 Val Phe Ala Arg Leu Asp Glu Glu Gln Gly Arg Arg Gln Cys Val Leu  
 180 185 190  
 Val Phe Pro Gln Pro Glu Ala Phe Trp Trp Arg Ala Ser Arg Leu Tyr  
 195 200 205  
 Thr Leu Val Leu Gly Phe Ala Ile Pro Val Ser Thr Ile Cys Ala Leu  
 210 215 220  
 Tyr Ile Thr Leu Leu Cys Arg Leu Arg Ala Ile Gln Leu Asp Ser His

12/13

225                      230                      235                      240  
 Ala Lys Ala Leu Asp Arg Ala Lys Lys Arg Val Thr Leu Leu Val Val  
                          245                      250                      255  
 Ala Ile Leu Ala Val Cys Leu Leu Cys Trp Thr Pro Tyr His Leu Ser  
                          260                      265                      270  
 Thr Ile Val Ala Leu Thr Thr Asp Leu Pro Gln Thr Pro Leu Val Ile  
                          275                      280                      285  
 Gly Ile Ser Tyr Phe Ile Thr Ser Leu Ser Tyr Ala Asn Ser Cys Leu  
                          290                      295                      300  
 Asn Pro Phe Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Asp Ser Phe Arg Arg Ser Leu  
 305                      310                      315                      320  
 Arg Gln Leu Val Ser Cys Arg Thr Ala  
                          325

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 987

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 20

atgcacaact tgcgctctt cgagcctggc aggggcaatg tgtcttgagg cgccccattt 60  
 ttgggctgtc ctaacgagtc gaaccagcgc cctctgccac tgccgcagcc tcigggcggtt 120  
 gcagtgcctg tggcttacgg ggtgatctgc gcggtgggac tggcgggcaa ctccgcggtg 180  
 ctgtacgtac tgctgcgcac gccgcgcatg aagactgtta ccaacgtgtt cattctcaac 240  
 ctggctatcg cggacgagct ctacacctc gtgctgcca tcaacatcgc ggacttcctg 300  
 ctgaggcgct ggcccttcgg ggaagtcatt tgcaagctca tcgtggctgt cgaccagtac 360  
 aacattttct ctacgtctta ctctctgcc gtcattgagc cagaccgcta cctgggtgtc 420  
 ctggccacag ccgagtcgcg ccgggtgtcc gggcgcaatt atggtgcagc gcgggctgtc 480  
 agtctggcgg tctgggctgt ggtgacattg gtctgtctgc cttttgcggt attcgcccg 540  
 ctggacgaag agcagggtcg gcgtcagtc gtgctggtct tccgcagcc tgaggccttc 600

13/13

tggtggcgcg ccagccgict gtacactcta gigtigggct tcgccatccc gggtgccacc 660  
atctgcgccc tctatatac cctgittgtc cgactgcgtg clatccagct agacagccac 720  
gccaaggccc tggaccgtgc caagaagcgc gtgacctgt tggtggtggc gattctggct 780  
gtgtgcctcc tctgtggac accgtaccac ctgagcacca tagtggcgct caccaccgac 840  
ctcccgcaaa caccgttggc catcggcata tcttacttca tcaccagtct gagctatgcc 900  
aacagctgcc tcaacccttt cctctatgcc ttcttggacg acagcttccg caggagcctg 960  
cggcagctgg tgtcatgcc cacagcc 987

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/007667

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/28, C12N5/10, C12P21/08, G01N33/53, G01N33/577,  
A61K39/395, A61P1/00, A61P1/04, A61P13/12, A61P15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/28, C12N5/10, C12P21/08, G01N33/53, G01N33/577,  
A61K39/395, A61P1/00, A61P1/04, A61P13/12, A61P15/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY (STN), CA (STN), SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), WPI (DIALOG),  
BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X         | WO 01/98494 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.),<br>27 December, 2001 (27.12.01),<br>& AU 200174562 A & EP 1293567 A1    | 1-51, 57-65,<br>67    |
| X         | WO 02/102847 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.),<br>27 December, 2002 (27.12.02),<br>& JP 2004-049003 A & EP 1403281 A1 | 1-51, 57-65,<br>67    |
| P, X      | WO 03/082907 A1 (EUROSCREEN SA.),<br>09 October, 2003 (09.10.03),<br>& US 2003/232756 A1                                   | 1-51, 57-65,<br>67    |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
01 September, 2004 (01.09.04)

Date of mailing of the international search report  
21 September, 2004 (21.09.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/007667

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 52-56, 66  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 52 to 56 pertain to diagnostic methods to be practiced on the human body and claim 66 pertains to method for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C07K 16/28, C12N 5/10, C12P 21/08, G01N 33/53, G01N 33/577, A61K 39/395, A61P 1/00, A61P 1/04, A61P 13/12, A61P 15/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C07K 16/28, C12N 5/10, C12P 21/08, G01N 33/53, G01N 33/577, A61K 39/395, A61P 1/00, A61P 1/04, A61P 13/12, A61P 15/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CA (STN), SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号   |
|-----------------|---|--------------------|
| X               | WO 01/98494 A1 (武田薬品工業株式会社) 2001. 12. 27<br>& AU 200174562 A & EP 1293567 A1    | 1-51, 57-65,<br>67 |
| X               | WO 02/102847 A1 (武田薬品工業株式会社) 2002. 12. 27<br>& JP 2004-049003 A & EP 1403281 A1 | 1-51, 57-65,<br>67 |
| P, X            | WO 03/082907 A1 (EUROSCREEN SA) 2003. 10. 09<br>& US 2003/232756 A1             | 1-51, 57-65,<br>67 |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01. 09. 2004

国際調査報告の発送日

21. 9. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4 B

9 2 8 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 52-56、66 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、

請求の範囲52-56は、人の身体の診断方法に関するものであり、また、請求の範囲66は、人の身体の治療方法に関するものである。

2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**